

蚕豆种子贮藏蛋白质组分的比较研究

石建斌¹, 侯万伟^{2,3}, 刘玉皎^{2,3}

(¹青海大学, 西宁 810016; ²青海省农林科学院, 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, 西宁 810016)

摘要:以 10 份蚕豆品种为材料, 利用 SDS-PAGE 方法, 对其种子贮藏蛋白亚基组成进行了分析, 结果表明: 不同品种间的种子贮藏蛋白具有一定的差异, 表现出一定的多态性; 共分离出 23 条迁移率不同的亚基条带, 13 条具有多态性; 利用贮藏蛋白亚基条带的信息, 分析了品种间的蛋白相似度, 相似度指数 0.619 ~ 0.947, 平均 0.744; 并通过聚类分析, 在遗传相似系数 0.8260 水平上, 将供试材料分为了 3 类, 其中第 2 类具有较丰富的多样性, 多样性指数达 3.9296; 共筛选出 7 对亲缘关系较远的杂交组合, 可为蚕豆品种选育提供一定的科学依据。

关键词:蚕豆; 种子贮藏蛋白; SDS-PAGE; 亲缘关系; 蛋白质亚基

Comparative Study on Seed Storage Protein of Faba Bean

SHI Jian-bin¹, HOU Wan-wei^{2,3}, LIU Yu-jiao^{2,3}

(¹Qinghai University, Xining 810016; ²Qinghai Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Xining 810016;

³The Cultivating Base of National Key Lab - Plateau Crop Gene Innovated and Utilized in Qinghai Province, Xining 810016)

Abstract: In order to investigate the difference of seed storage proteins in Faba bean, seed storage proteins extracted from ten species of Faba bean were analyzed with SDS-PAGE. The result showed that it is different among the seed storage proteins of faba bean, a total of 23 subunits of different Rf were detected, counting 13 polymorphic protein subunits. The similarity index of seed storage proteins subunits in Faba bean is 0.619 ~ 0.947, with an average of 0.744. Cluster analysis divided the accessions into three major clusters in the level of 0.8260 GS, the second cluster showed higher polymorphism, and 7 pair Faba bean were identified as the parents.

Key words: Faba bean; Seed storage protein; SDS-PAGE; Genetic relationship; Protein subunits

蚕豆又名胡豆, 是人类最常用的食用豆类作物之一。世界上有 40 多个国家种植蚕豆, 其中亚洲的种植面积最多, 面积和总产量约占全世界的 55%, 中国的栽培面积和产量居世界前列^[1]。蚕豆的蛋白质含量仅次于大豆, 平均含量达 25% ~ 32%, 其氨基酸组成与人体所需的必需氨基酸的组成相类似, 每 100g 蚕豆中含有人体 9 种必需氨基酸的总量达 7347mg^[2], 是人类理想的植物蛋白来源。

种子贮藏蛋白 (Seed storage proteins, 简称 SSPs) 是近年来应用较广泛的一种生化标记。在水稻、小麦和大豆的研究中已被广泛应用^[3-5], 蛋白质的合成受植物体内基因的控制, 是很好的遗传标记。由于蛋白质分子量大小不一, 所带电荷不同, 所以利

用电泳法, 可以根据蛋白质在立体网状结构的凝胶中移动速度不同, 分离出蛋白质分子, 表现出蛋白质分子谱带的差异, 不同的品种和杂交种具有不同的谱带模式, 从而可以从蛋白质水平鉴别出不同植物材料的差异, 种子贮藏蛋白作为遗传标记已被广泛应用于种、属间关系、种内遗传多样性分析、品种鉴定以及植物繁育系统的鉴别^[6]。根据溶解度的不同大豆种子贮藏蛋白可划分为 4 类^[7], 包括溶于水的清蛋白、溶于盐的球蛋白、溶于乙醇的醇溶蛋白和溶于稀酸和稀碱的谷蛋白; 李雪琴等^[8]曾用 SDS-PAGE 方法对蚕豆贮藏蛋白亚基的大小进行了研究; 李萍等^[9]采用分级提取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

收稿日期: 2011-09-06 修回日期: 2011-12-16

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

作者简介: 石建斌, 硕士研究生, 作物遗传育种专业。E-mail: shijianbin@163.com

通讯作者: 刘玉皎, 研究员, 硕士生导师, 主要从事蚕豆种质资源创新与改良利用研究。E-mail: Lyujiao2000@yahoo.com.cn

有一定的清蛋白被提取。本研究对几种蚕豆种子的贮藏蛋白进行了 SDS-PAGE 分析,目的在于了解相关品种各种贮藏蛋白的构成状况,为专用品种筛选及其相关的育种工作提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

青海 11 号、青海 12 号、青海 13 号、大通马牙、大通尕大豆、TF16、166、陵西一寸、脏脸、TF46。

1.2 方法

1.2.1 种子贮藏蛋白样品的提取 参照 Kumamaru 等^[10]提取种子全蛋白的方法,并有所改进。将成熟蚕豆种子研磨成粉,并过 80 目筛,称干粉 0.05g,全部转入干净的 1.5ml eppendorf 管中,加入 35 μ l β -ME 浸润 20min,然后加入 675 μ l 40 $^{\circ}$ C 温育的 SDS-urea 蛋白抽提液(8 mol/L 尿素,4 % SDS,20% 甘油,50mmol/L Tris-HCl,pH 6.8,少许溴酚蓝),剧烈涡旋数秒钟,使样品完全呈透明状溶液,室温静置 48 h 后,于 4 $^{\circ}$ C 8000r/min 离心 5min,上清液用于随后的 SDS-PAGE 分析。

1.2.2 SDS-PAGE 电泳 取适量蛋白上清液按 1:1 (V/V) 加入样品裂解液(3.123ml 1.0mol/L, pH 6.8 的 Tris-HCl + 1g SDS + 5ml 甘油 + 1.5ml β -巯基乙醇 + 少许溴酚蓝,用蒸馏水定容至 50ml),于沸水中煮沸 3 ~ 5min,冷却后点样。电泳采用不连续垂直板状凝胶电泳,参考 Laemmli 法并稍作修改^[11-17],凝胶厚度 1.5mm,浓缩胶浓度 4%,分离胶浓度 12%,样品上样量 10 μ l,恒流 30mA,待指示剂迁移至凝胶底部后结束电泳。

1.2.3 染色和脱色 采用考马斯亮蓝染色^[18] 1h,用蒸馏水漂洗 2 ~ 3 次,再用脱色液(无水乙醇:冰醋酸:水 = 4:1:5)在脱色摇床上脱色至各亚基条带清晰,蒸馏水漂洗后拍照。

1.3 数据处理

根据电泳结果计算每个材料蛋白条带的 Rf 值及统计蛋白质亚基条带数,蛋白质的相对迁移率 $Rf = \text{蛋白带迁移距离} / \text{溴酚蓝迁移距离}$ 。记录样品中产生的多态性蛋白带,同一 Rf 值位置上有蛋白条带的记为 1,无蛋白带记为 0,多样性指数 $H_0 = -\sum P_i \ln P_i$,这里 P_i 指某群体内第 i 条谱带的频率。用 Ntsys 2.10 软件聚类分析。

2 结果与分析

2.1 蚕豆种子贮藏蛋白质亚基分析

种子贮藏蛋白主要分为 4 类:清蛋白、球蛋白、

醇溶蛋白和谷蛋白,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^[19],为了探究蚕豆种质间的种子贮藏蛋白的差异,提取种子贮藏蛋白后进行 SDS-PAGE 分析。供试的 10 个品种的蛋白谱带存在差异,所试材料的贮藏蛋白共表现出 23 条迁移率不同的谱带,13 条具有多态性。其中亚基数最多的是青海 11 号、青海 12 号和 TF46,共 19 条带,大通马牙和 166 最少,仅 15 条。品种间的差异主要表现在 40.0 ~ 116.0kD 之间(图 1)。同时,所有供试材料都含有 Rf 值为 0.159、0.265、0.318、0.364、0.483、0.503、0.682、0.709、0.828、0.927 的 10 条共同的蛋白带。

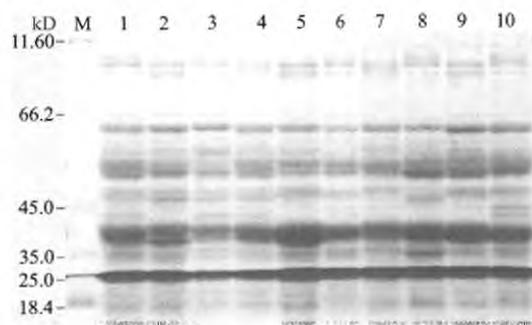


图 1 蚕豆种子贮藏蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE of seed storage proteins of Faba bean

M: Marker; 1: 青海 12 号; 2: 青海 13 号; 3: 大通马牙; 4: 大通尕大豆; 5: TF16; 6: 166; 7: 陵西一寸; 8: 脏脸; 9: TF46; 10: 青海 11 号

M: Marker; 1: Qinghai12; 2: Qinghai13; 3: Datong Maya;

4: Datong Gadadou; 5: TF16; 6: 166; 7: Lingxiyicun;

8: Zangliang; 9: TF46; 10: Qinghai11

2.2 种子蛋白质亚基相似性及亲缘关系

蛋白质亚基的构成严格受基因的控制,因此稳定的蛋白质亚基谱就直接地反映了基因型的异同,而蛋白质电泳图谱是非常稳定的^[6], Vaughan 等^[20]提出蛋白质谱或酶谱相似性指数愈高,亲缘关系愈近。所以根据蛋白质亚基构成的相似性指数就能预测亲缘关系。表 1 是蚕豆品种间的蛋白质亚基相似性指数,可以看出,不同品种间共有的蛋白质亚基数量不等,相同亚基数 12 ~ 18 条,平均 14.8 条,相似性指数 0.619 ~ 0.947,平均 0.744。TF16 与 TF46 间的相同蛋白质亚基数最多,在两者共有 19 条蛋白质亚基中相同亚基数达 18 条,仅 1 条亚基不同,相似性指数达 0.947;其次是与青海 13 号,两者共有 19 条蛋白质亚基,相同亚基数达 17 条,仅 2 条亚基不相同,相似性指数达 0.895;

相似度指数最小的出现在大通马牙和陵西一寸、大通杂大豆和 166 间,各对均共有蛋白亚基 20

条,其中 12 条亚基相同,不同的亚基数达 8 条,相似度指数仅为 0.600。

表 1 蚕豆种子蛋白质亚基相似度指数

Table 1 Similarity index of seed storage proteins subunits in Faba bean

种类	相同亚基数	不同亚基数	相似度指数	种类	相同亚基数	不同亚基数	相似度指数				
Species	No. of similar subunits	No. of different subunits	Similarity index	Species	No. of similar subunits	No. of different subunits	Similarity index				
青海 12 号	青海 13 号	16	5	0.762	大通杂大豆	TF16	14	7	0.667		
	大通马牙	15	4	0.789		166	12	8	0.600		
	大通杂大豆	16	4	0.800		陵西一寸	13	8	0.619		
	TF16	15	7	0.682		脏脸	13	8	0.619		
	166	14	6	0.700		TF46	15	6	0.714		
	陵西一寸	14	8	0.636		青海 11 号	14	8	0.636		
	脏脸	16	4	0.800		TF16	166	15	3	0.833	
	TF46	16	6	0.727			陵西一寸	16	3	0.842	
	青海 11 号	17	4	0.810			脏脸	15	5	0.750	
	青海 13 号	大通马牙	14	5			0.737	TF46	18	1	0.947
		大通杂大豆	15	5			0.750	青海 11 号	17	3	0.850
TF16		17	2	0.895	166	陵西一寸	13	6	0.684		
166		14	5	0.737		脏脸	14	4	0.778		
陵西一寸		16	3	0.842		TF46	15	4	0.789		
脏脸		16	3	0.842		青海 11 号	15	4	0.789		
TF46		17	3	0.850		陵西一寸	脏脸	14	6	0.700	
青海 11 号		16	5	0.762	TF46		16	4	0.800		
大通马牙		大通杂大豆	14	4	0.778		青海 11 号	15	6	0.714	
		TF16	13	7	0.650		脏脸	TF46	15	6	0.714
		166	12	6	0.667			青海 11 号	16	4	0.800
	陵西一寸	12	8	0.600	TF46	15		4	0.810		
	脏脸	13	6	0.684	TF46	17		4	0.810		
	TF46	13	8	0.619							
	青海 11 号	14	6	0.700							

2.3 种间遗传距离和聚类分析

种子贮藏蛋白多态性反映了蚕豆基因组中编码这些蛋白质基因的变异情况,因此根据蚕豆种子贮藏蛋白电泳获得的 23 条蛋白带的 Rf 值信息,对 10 个蚕豆品种进行不加权类平均法(UPGMA)分析,从而进一步揭示其亲缘关系(图 2),在遗传相似系数 0.8260 水平上,可将供试蚕豆品种分为 3 类。

第 I 类包括青海 12 号、大通马牙和大通杂大豆,多样性指数为 1.9095;3 种材料间的遗传相似系数相等,为 0.8261;该组包含了 23 种带型中的 20 条带,且有 14 条为共有带,占 70%;青海 12 号含有 Rf 值为 0.132、0.397 的 2 条特异条带,其他 2 种材料不含该条带。

第 II 类包括青海 13 号、TF16、TF46 和陵西一

寸,多样性指数为 3.9296;遗传相似系数 0.8696 ~ 0.9565,幅度 0.0869,TF16 与 TF46 之间的相似系数最大,达 0.9565,表明两者间有遗传距离最小,亲缘关系最近;该组包含了 23 种带型中的 20 条带,且有 16 条为共有带,占 80%;陵西一寸含有 Rf 值为 0.430 的特异条带,其他所有供试材料均不含该条带,TF46 含有 1 条 Rf 值为 0.517 的条带,该组其他材料不含该条带。

第 III 类包括 166、青海 11 号和脏脸,多样性指数为 1.3689;3 种材料间的遗传相似系数相等,为 0.8261;该组包含了 23 种带型中的 20 条带,且有 14 条为共有带,占 70%;青海 11 号含有 Rf 值为 0.556、0.642 的 2 条特异带,166 和脏脸不含该条带,但脏脸含 1 条 Rf 值为 0.589 的特异条带。

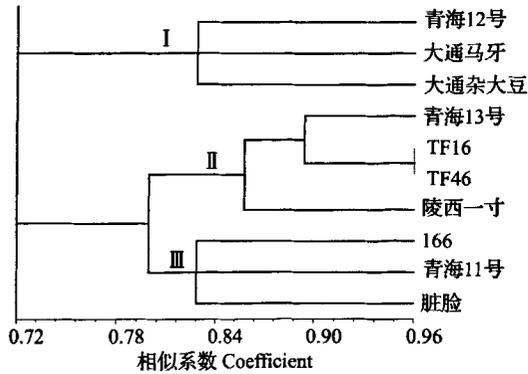


图2 蚕豆种子贮藏蛋白聚类图

Fig. 2 The clusters of seed storage proteins from Faba bean

3 讨论

3.1 蚕豆种子贮藏蛋白质亚基差异

该研究通过 SDS-PAGE 方法,明确了 10 份不同供试材料的贮藏蛋白亚基构成情况。从电泳结果来看,共分离出 23 条迁移率不同的亚基条带,不同品种间共有的蛋白质亚基数量不等,相同亚基数 12 ~ 18,平均 14.8 条。从种子蛋白亚基相似度指数来看,TF16 与 TF46 的相似度指数最大,达 0.947;相似度指数最小的出现在大通马牙和陵西一寸、大通杂大豆和 166 间,为 0.600,该分析结果与 2.3 中的聚类分析相吻合。聚类分析中第 II 类的多样性指数最大,为 3.9296,表明该类中的蚕豆品种存在较大的遗传变异。

通过分析,以品种间的遗传距离为依据,共筛选出 7 对杂交亲本组合,分别为青海 12 号/陵西一寸、陵西一寸/大通马牙、大通马牙/TF46、大通杂大豆/166、大通杂大豆/陵西一寸、大通杂大豆/脏脸、大通杂大豆/青海 11 号,每对组合内的两个亲本间的遗传相似系数为 0.6522,遗传距离为 0.3478。

3.2 研究意义及应用前景

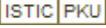
种子贮藏蛋白亚基的组成与蛋白的营养及加工品质密切相关^[21],本研究通过比较供试材料贮藏蛋白亚基的组成,筛选出亲缘关系较远的蚕豆品种,以其为亲本,设置杂交组合并进行种质筛选,调整后代的亚基组成,从而提高蚕豆蛋白的营养品质,为以后

的品种选育及培育高蛋白蚕豆和加工品质优良的蚕豆品种提供一定的科学依据。

参考文献

- [1] 杨海涛,刘军海. 蚕豆蛋白质提取工艺的研究[J]. 食品研究与开发,2008,29(2):76-78
- [2] 吴春芳,姜永平,徐泉方. 蚕豆对改善居民营养的作用[J]. 中国食物与营养,2006(12):51-53
- [3] 金伟栋,李娜,洪德林. 粳稻品种间种子贮藏蛋白多态性分析[J]. 南京农业大学学报,2007,30(1):7-13
- [4] 舒晓霞,李伟,董攀. 圆锥小麦贮藏蛋白的遗传多样性研究[J]. 麦类作物学报,2008,28(1):66-73
- [5] 韩琳娜,郭庆梅,周凤琴. 野生大豆与栽培大豆种子贮藏蛋白含量的 PAGE 分析[J]. 大豆科学,2009,28(2):321-324
- [6] 孔芳,蒋金金,吴磊,等. 芸薹属种子贮藏蛋白质组分的比较研究[J]. 中国油料作物学报,2010,32(1):20-24
- [7] 孟祥勋. 大豆种子贮藏蛋白研究[J]. 东北农业大学学报. 1997,28(2):201-207
- [8] 李雪琴,苗笑亮,裘爱泳. 蚕豆分离蛋白的制备及其功能性质研究[J]. 粮食与饲料工业,2003(5):41-43
- [9] 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
- [10] Kumamaru T, Satoh H, Iwata N, et al. Mutants for rice storage proteins. I | Screening of mutants for rice storage proteins of protein bodies in the starchy endosperm[J]. Theor Appl Genet, 1988, 76:11-16
- [11] Colligan J E, Dum B M, Speicher D W. Short Protocols in Protein Science [M]. 李慎涛,张富春,译. 北京:科学出版社,2007:291-296
- [12] 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[J]. 中国油料,1991(4):17-21
- [13] 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
- [14] Qu L Q, Satoh H, Ogawa M. Improved electrophoretic analyses for rice seed storage glutelin [J]. Acta Gene Sci,2001,28(8):730-737
- [15] 梁明山,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
- [16] 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
- [17] Acrylamide casting handbook [M]. Uppsala: Pharmacia Biotech AB, 1994:21-28
- [18] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社,1999:54-87
- [19] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage [J]. Nature,1970,227:680-685
- [20] Vaughan J G, Hemingway J S, Schofield H J. Contribution to a study of variation in *Brassica juncea* Coss. et Czern [J]. J Linnean Soc (Botany), 1963,58(3):435-447
- [21] 刘珊珊,刁桂珠,王志坤. 中国和越南大豆种质资源贮藏蛋白亚基组成的鉴定[J]. 中国油料作物学报,2008,30(4):511-513

蚕豆种子贮藏蛋白质组分的比较研究

作者: [石建斌](#), [侯万伟](#), [刘玉皎](#), [SHI Jian-bin](#), [HOU Wan-wei](#), [LIU Yu-jiao](#)
作者单位: [石建斌, SHI Jian-bin\(青海大学, 西宁, 810016\)](#), [侯万伟, 刘玉皎, HOU Wan-wei, LIU Yu-jiao\(青海省农林科学院, 西宁810016; 青海省高原作物种质资源创新与利用-国家重点实验室培育基地, 西宁810016\)](#)
刊名: [植物遗传资源学报](#) 
英文刊名: [Journal of Plant Genetic Resources](#)
年, 卷(期): 2012, 13(2)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201202024.aspx