

大豆 11S/7S 蛋白亚基优异种质资源鉴定与分析

高慧慧¹, 董斌¹, 王星月¹, 董琳欣¹, Mayamiko Masangano¹,
申一帆¹, 唐鹏彬¹, 魏鹏程¹, 杨蕾¹, 邱丽娟², 王晓波¹
(¹安徽农业大学农学院, 合肥 230036; ²中国农业科学院作物科学研究所/农作物基因资源与
基因改良国家重大工程/农业农村部北京大豆生物学重点实验室, 北京 100081)

摘要: 大豆 Lox 可以使大豆产生豆腥味, 7S 球蛋白是潜在的致敏源, 很大程度上限制了人们对大豆的食用。因此, 选育 Lox 和 7S 球蛋白缺失或高 11S/7S 比值的大豆品种, 有助于提高大豆自身的营养价值, 培育适合加工不同豆制品的大豆新品种。我国具有丰富的大豆种质资源, 但是尚未见大范围开展大豆蛋白亚基组成分析的报告。本研究利用优化后的大豆蛋白 SDS-PAGE 提取方法, 测定了来源于我国大豆种质资源库的 2713 份大豆种质的蛋白亚基组成, 并对影响蛋白亚基含量的遗传和环境因素进行分析。研究结果表明, 大豆 7S 球蛋白与 11S 球蛋白之间呈极显著负相关, 地方品种 11S/7S 比值大于选育品种, 年份对 7S 和 11S 球蛋白含量及比值有显著影响, 蛋白质含量、油分含量对大豆亚基组成无显著影响。研究筛选出大豆蛋白亚基组成特异种质资源 15 份, 包括 4 份 11S/7S 比值大于 3.0 且无亚基结构变异的材料, 5 份 Lox 缺失材料, 1 份 α' 亚基缺失材料, 2 份 α 亚基缺失材料, 1 份 β 亚基缺失的材料, 1 份 11S/7S 比值大于 3.0 且 Lox 缺失的材料和 1 份 7S 亚基完全缺失材料, 这些种质资源的鉴定为大豆优质育种和不同豆制品加工奠定了材料基础。

关键词: 大豆蛋白亚基; 11S/7S 比值; 优异种质资源

Screening and Analysis of Excellent Germplasm Resources with Elite 11S/7S Protein Subunits

GAO Huihui¹, DONG Bin¹, WANG Xingyue¹, DONG Linxin¹, MAYAMIKO Masangano¹, SHEN Yifan¹,
TANG Pengbin¹, WEI Pengcheng¹, YANG Lei¹, QIU Lijuan², WANG Xiaobo¹

(¹School of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230036; ²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/Key Laboratory of Soybean Biology in Beijing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100081)

Abstract: The beany flavor and potential allergenicity of soybean caused by Lox and 7S globulin limit human consumption. Breeding for soybean varieties with Lox and 7S globulin deficiency or high 11S/7S ratio is, therefore, of interest to improve the nutritional value and process different soybean products. In this study, the protein subunit composition of 2713 soybean germplasms was determined by the optimized soybean protein SDS-PAGE extraction method. The soybean germplasm resources with different protein subunit composition types were excavated, and the genetic and environmental factors affecting the protein subunit content were analyzed. The results identified a significant negative correlation between 7S globulin and 11S globulin. The 11S/7S ratio of local varieties was higher than that of modern varieties. A significant difference on the content and ratio of 7S and 11S globulin were observed in samples harvested from years. There was no significant correlation between

收稿日期: 2023-05-13 修回日期: 2023-06-26 网络出版日期: 2023-07-19

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230513003>

第一作者研究方向为大豆遗传育种, E-mail: huihuigao@ahau.edu.cn; 董斌、王星月为共同第一作者

通信作者: 邱丽娟, 研究方向为大豆种质资源研究, E-mail: qiulijuan@caas.cn

王晓波, 研究方向为大豆分子遗传育种, E-mail: wxbphd@163.com

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFD1201605); 国家自然科学基金(32101772)

Foundation projects: The National Key Research and Development Program of China (2021YFD1201605); National Natural Science Foundation of China (32101772)

7S and 11S globulin and their subunits and protein and oil content. A total of 15 soybean germplasm resources with specific composition of soybean protein subunits were screened, including four showing 11S/7S ratio greater than 3.0 without subunit structural variation, five with Lox deletion, one with α' subunit deletion, two with α subunit deletion, one with β subunit deletion, one with 11S/7S ratio greater than 3.0 and Lox deletion, and one with complete deletion of 7S subunit. The identification of these germplasms laid a material foundation in breeding of high-quality soybean varieties applicable for different soybean products.

Key words: soybean protein subunit; 11S / 7S ratio; excellent germplasm resources

大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 起源于中国, 是种植最广泛的经济作物之一, 大豆种子中蛋白质含量约 40%, 是非常重要的植物蛋白资源。据推算种一亩大豆可获得的蛋白质远大于小麦和玉米, 并且大豆蛋白的氨基酸组分齐全^[1-3], 具有预防心血管病、减肥、预防骨质疏松等一些生理保健功能^[4-6]。因此, 挖掘并开发大豆蛋白品质相关的优异种质资源具有十分重要的意义。

根据沉降系数, 大豆蛋白质可分为 2S、7S、11S 和 15S 组分, 其中 7S 和 11S 球蛋白约占大豆蛋白质含量的 70% 左右, 是大豆种子贮藏蛋白的主要成分^[7-8]。11S 和 7S 的亚基组成成分不同导致其具有不同的功能特性。7S 球蛋白具有高乳化性, 适用于豆浆、豆乳等制作, 11S 球蛋白具有高凝胶性, 比较适用于豆腐加工等^[9-11]。据研究表明 7S 球蛋白含量的减少会导致 11S 球蛋白含量补偿性的增加, 因此通过调整 11S/7S 的比例, 可以改良大豆蛋白的营养品质, 改善大豆蛋白的加工特性。

目前大豆蛋白的开发和利用已受到世界各国的普遍重视, 7S 和 11S 球蛋白也是国内外学者研究的重点。杨慧等^[12]对大豆主要过敏原及其脱敏方法进行论述, 文章提到 7S 球蛋白组分中的 GlymBd 30K 和 GlymBd 28K, β -伴大豆球蛋白中的 GlymBd 60K 是 3 种主要的过敏原。刘春等^[13]以 1400 份大豆品种资源为材料, 利用 SDS-PAGE 分析贮藏蛋白 11S 和 7S 组分及其亚基含量与亚基缺失情况, 鉴定出 34 份亚基含量特异材料, 并用 EMS 和 60Co γ 射线分别处理部分品种种子, 从 M_3 代种子中筛选出了 211 粒亚基变异种质。Stanojevic 等^[14]根据 6 个大豆品种蛋白质亚基组成, 将其蛋白质品质与豆腐品质进行相关性分析, 结果表明: 品种间种子中 11S/7S 蛋白比值对豆腐得率和凝胶硬度有影响, 此外, 7S 球蛋白的大豆 β -亚基对豆腐硬度有负面影响 ($r = 0.91, P < 0.05$)。Boehm 等^[15]以高蛋白品种 Harovinton 为母本, 以缺失 7S 和 11S 球蛋白部分亚基的品系为父本, 构建了 F_2 定位群体和 F_3 重组自交系群体。在

第 3 染色体 (11S A1)、第 10 染色体 (7S α' 和 11S A4) 和第 13 染色体 (11S A3) 检测到大豆贮藏蛋白 QTL, 并在 F_5 的 RIL 群体中得到验证。我国对大豆蛋白 11S 和 7S 组分虽有一定研究, 但前人研究多集中于大豆种质资源的筛选阶段, 有关亚基缺失种质 11S/7S 组分分析的报道较少。

本研究利用丰富的大豆种质资源, 通过 SDS-PAGE 技术对大豆蛋白亚基进行表型鉴定, 分析大豆种质贮藏蛋白 11S 和 7S 球蛋白组分的组成特点, 明晰各亚基的相关性, 探究了包括地理来源、年份等可能影响大豆 11S/7S 比值的因素, 同时筛选出亚基优异材料, 为优异大豆蛋白品质育种、大豆蛋白亚基遗传效应及其调控基因的表达机制研究提供优良种质材料。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

选用 2713 份大豆材料, 未明确地理来源的 1657 份, 明确地理来源的 1056 份, 其中包括地方品种 (307 份)、选育品种 (729 份) 以及人工创制的材料 (20 份)。以上材料均由中国农业科学院作物科学研究所大豆种质资源课题组提供。

1.2 试验方法

1.2.1 田间种植 2021 年和 2022 年夏季在安徽农业大学北综合试验站 (宿州市埇桥区, 33°44' 17"N, 117°2' 14"E) 播种, 单行播种, 行长 2.2 m, 行距 0.4 m, 株距 10 cm。

大豆播种时, 坚持不混合、不漏播和不断条的原则, 保证播种均匀。播种后, 及时掌握出苗及生长状况, 并做好相应的补苗工作。根据留苗密度进行间苗, 留苗要求均匀一致, 拔除病苗、弱苗和杂苗, 保留壮苗。时刻关注天气状况, 大暴雨来临前及时做好田间防涝措施减少灾害损失或者提前规划好沟渠系统、疏通田间排水工程, 做好防涝减灾工作。同时应定期做好浇水、人工中耕除草、叶面追肥及病虫害防治等工作。

1.2.2 SDS-PAGE 梯度电泳法 参考张国敏等^[16]、张明俊等^[17]的11S和7S球蛋白提取方法,并在试验样品用量和样品处理方式上进行了优化。在试验样品用量上,设置1 mg、3 mg、5 mg 3种样品用量,分别称取3个品种(ZDD24655、绿壳豆、泉变11)3种样品用量进行检测以确定最佳用量,每个重复3次。在样品处理方式上,使用2个品种(皖黄506、中黄13),设置2种不同处理,处理1:将样品涡旋混匀后,12000 r/min条件下离心5 min;处理2:将样品涡旋混匀后,金属浴100℃5 min,12000 r/min条件下离心5 min。每个处理重复3次。

优化后梯度电泳步骤:(1)样品制备:将大豆磨至粉末状,过60目筛,称量1 mg豆粉,放入1.5 mL的EP管中,加入100 μL蛋白提取液(提取液:巯基乙醇=50:1),涡旋混匀后静置,12000 r/min条件下离心分离5 min,取上清液5 μL用于SDS-PAGE,3个重复。(2)制胶电泳:用PAGE凝胶快速制备试剂盒(12.5%)(中国上海雅酶生物科技有限公司)制备胶,凝胶厚度1 mm,电泳开始电压设置为80 V,等溴酚蓝指示剂在浓缩胶底端的时候,将电压调至120 V。在溴酚蓝带指示剂跑到距离玻璃板最下端1 cm时结束电泳。(3)染色:将凝胶放于塑料盒中,加入染脱一体的蛋白染胶液,放水平摇床上染色30 min。染色好的凝胶用Bio-Rad的Gel DocTMEZ Imager凝胶成像系统拍照。

1.2.3 亚基含量及11S/7S比值计算 11S球蛋白(A3、AS、BS、A5)和7S球蛋白(α' 、 α 、 β)组分及其亚基的含量用Image Lab软件分析确定,再进一步计算出11S/7S比值。

1.2.4 大豆籽粒油分、蛋白质含量检测 使用波通DA7200近红外分析仪测定了932份(其中382份明确地理来源)大豆籽粒的蛋白质含量、油分含量,3次重复,取平均值用于数据分析。

1.3 统计分析

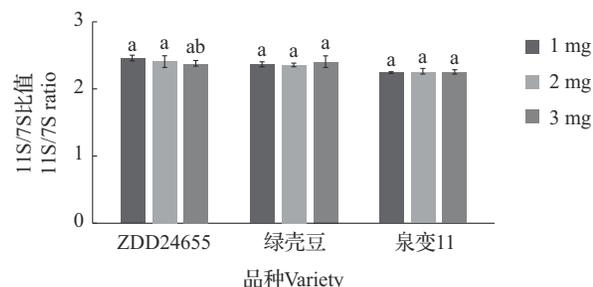
采用Excel 2010建立原始文档,运用SPSS 25.0软件进行数据统计、显著性分析及相关性分析。运用OriginPro 2022软件进行图表制作。

2 结果与分析

2.1 11S和7S蛋白亚基分离制备方法的建立及优化

通过比较3个不同样品用量的蛋白电泳结果(图1),发现3种样品用量对11S/7S比值无显著影响,因此1 mg微量的豆粉也可以检测大豆蛋白各亚基的含量,确立了微量检测法。与常规的方法相

比,优化后的方法在样品用量上减少了80%,试剂用量上节约了80%,试剂用量见表1。



字母a、b代表差异达 $P < 0.05$ 显著水平

The letters a and b represent significant difference at $P < 0.05$ level

图1 不同称量11S/7S比值的比较

Fig.1 Comparison of 11S/7S ratios with different sample weights

表1 不同样品量所需的试剂用量

Table 1 Reagent dosage required for different sample amounts

序号 No.	样品用量(mg) Sample account	蛋白提取液(μ L) Protein extract	巯基乙醇(μ L) 2-Mercaptoethanol
1	1	98	2
2	3	294	6
3	5	490	10

在试验样品用量优化的基础上,将样品进行两种不同处理,不同处理后的样品SDS-PAGE电泳胶图见图2。结果表明,在处理1即无加热处理时,11S球蛋白的A3亚基条带更为明显,在处理2即加热的处理下A3亚基发生了解离,导致A3亚基蛋白条带变浑浊,而Lox条带与7S球蛋白的 α' 亚基不能完全分离,说明加热处理对大豆11S和7S蛋白分离会产生不利影响。

通过比较试验样品用量以及样品处理方式不同对蛋白电泳的结果,优化后的试验流程见图3。

2.2 大豆7S和11S球蛋白相对含量及其比值分析

对2021年和2022年的大豆7S和11S球蛋白各亚基相对含量及其比值进行分析,发现各亚基相对含量在两年度间存在一定的差异(表2),2022年的7S球蛋白相对含量较低,而11S蛋白含量相对较高,11S/7S比值与2021年相比整体升高了约0.2(图4)。2022年的7S球蛋白变异系数相对于2021年升高了1.5%,11S升高了0.4%,其中11S和7S球蛋白各亚基相对含量在两年间差异范围最大达40%,说明11S和7S球蛋白的相对含量可能会受种植年份环

境条件的影响。由表3可知,不同年份间A3和A5蛋白亚基含量差异不显著,但大豆总7S和11S球蛋白

含量及比值受年份影响,差异显著。综上所述,大豆种质资源蛋白亚基的含量易受到年份的影响。

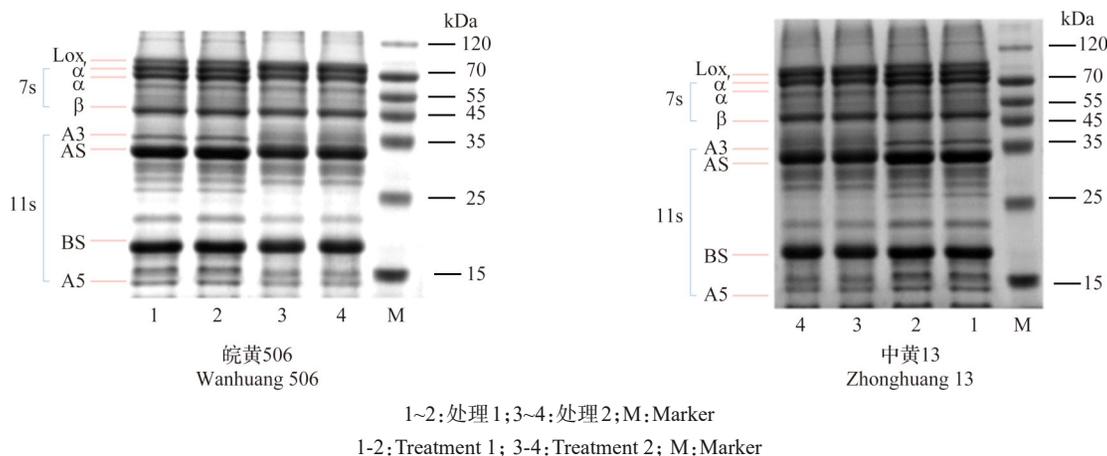


图2 皖黄506和中黄13的A3亚基热稳定性电泳图

Fig.2 Electrophoresis of thermal stability of A3 subunit of Wanhuang 506 and Zhonghuang 13

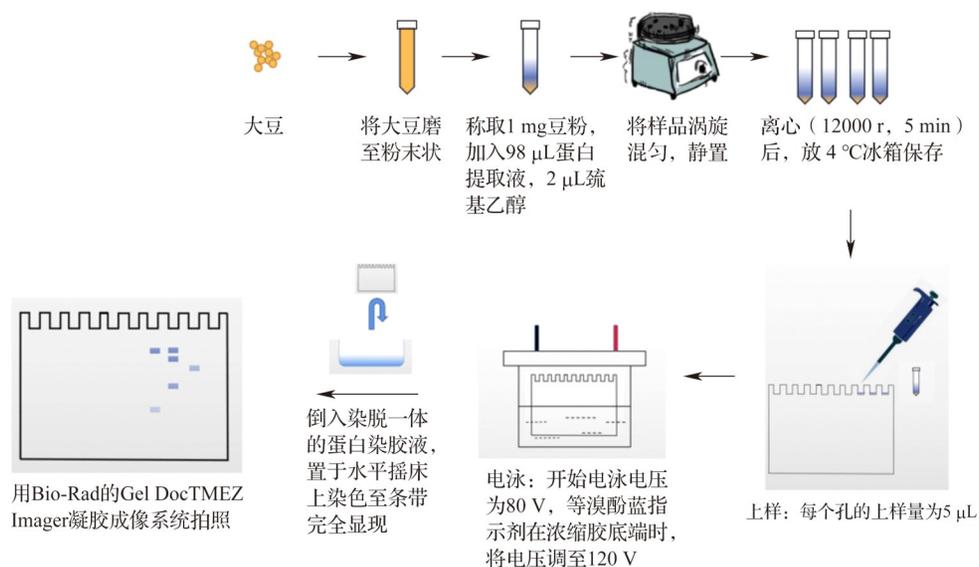


图3 优化后的SDS-PAGE凝胶电泳试验流程

Fig.3 Optimized SDS-PAGE gel electrophoresis experiment process

表2 大豆种质2年7S和11S球蛋白主要构成亚基含量分析

Table2 Subunit content analysis of 7S and 11S proteins in soybean germplasm for 2 years

年度 Year	参数 Parameter	α'亚基含量(%) α' unit content	α亚基含量(%) α unit content	β亚基含量(%) β unit content	A3亚基含量(%) A3 unit content	AS亚基含量(%) AS unit content
2021	变幅	4.9~16.5	5.2~14.3	4.6~31.1	4.3~21.1	12.4~25.3
	平均±标准差	9.3±1.8	10.0±1.6	13.8±2.4	11.3±2.5	20.0±1.9
	变异系数(%)	18.9	16.2	17.1	22.4	9.3
2022	变幅	4.3~24.2	3.4~15.7	5.8~28.0	4.5~20.7	9.4~23.7
	平均±标准差	9.8±2.1	8.9±2.1	12.7±2.5	10.9±2.2	18.1±2.6
	变异系数(%)	21.1	26.4	19.8	19.7	14.4
两年平均 Two years mean	变幅	4.3~24.2	3.4~15.7	4.6~31.1	4.3~21.1	9.4~25.3
	平均±标准差	9.5±1.9	9.5±2.1	13.2±2.5	11.1±2.4	19.1±2.5
	变异系数(%)	20.3	22.2	18.9	21.2	12.9

表 2(续)

年度 Year	参数 Parameter	BS 亚基含量(%) BS unit content	A5 亚基含量(%) A5 unit content	总 7S 含量(%) 7S content	总 11S 含量(%) 11S content	11S/7S 比值 11S/7S ratio
2021	变幅	17.2~32.2	5.0~25.7	24.6~47.7	52.3~75.4	1.1~3.1
	平均±标准差	24.1±2.7	11.6±2.7	33.1±3.2	66.9±3.2	2.0±0.3
	变异系数(%)	11.3	23.6	9.6	4.7	14
2022	变幅	9.7~31.5	4.5~20.9	24.8~43.8	56.2~75.2	1.3~3.3
	平均±标准差	20.3±3.8	11.8±2.7	31.4±0.35	68.6±3.5	2.2±0.3
	变异系数(%)	18.7	23.1	11.1	5.1	15.7
两年平均 Two years mean	变幅	9.7~32.2	4.5~25.7	24.6~47.7	52.3~75.4	1.1~3.3
	平均±标准差	22.2±3.8	11.7±2.7	32.3±3.4	67.7±3.4	2.1±0.3
	变异系数(%)	17.2	23.3	10.6	5.4	15.5

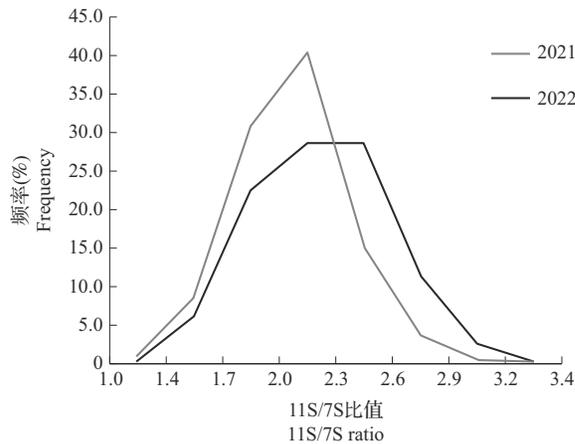


图 4 大豆不同年份 11S/7S 比值频率分布

Fig.4 The frequency distribution of 11S/7S ratio of soybean in 2 years

2.3 地方品种和选育品种 11S/7S 比值的分析

对大豆地方品种和选育品种 11S/7S 比值进行

分析,发现大豆地方品种的 11S/7S 比值均值大于选育品种,且变异系数也大于选育品种(表 4),暗示地方品种比选育品种在蛋白亚基组成上具有更丰富的遗传变异,在大豆蛋白质品质遗传改良上具有潜在利用价值。

2.4 不同地理来源种质资源分析

针对目前来源地明确的种质资源 1056 份(中国华北 99 份,中国东北 322 份,中国黄淮 138 份,中国华南 388 份,国外 109 份),对不同地理来源种质资源的 11S/7S 比值进行分析(图 5),结果表明来源于华北地区的大豆 11S/7S 比值平均为 2.076,来源于东北地区的大豆 11S/7S 比值平均为 1.747,来源于黄淮地区的大豆 11S/7S 比值平均为 1.952,来源于华南地区的大豆 11S/7S 比值平均为 1.939,来源于国外地区的大豆 11S/7S 比值平均为 2.046,表明地理来源对大豆种质资源 11S/7S 比值存在一定影响。

表 3 大豆籽粒贮藏蛋白年份间的蛋白亚基含量方差分析

Table3 Analysis of variance of protein subunit content in soybean grain storage protein between years

指标 Index	自由度 df	离均差平方和 SS	均方 MS	F	Pr > F
11S/7S 比值 11S/7S ratio	1	7.69	7.69	75.76**	< 0.01
总 11S 含量 11S content	1	0.072	0.072	65.38**	< 0.01
总 7S 含量 7S content	1	0.072	0.072	65.38**	< 0.01
α' 亚基含量 α' unit content	1	0.008	0.008	20.65**	< 0.01
α 亚基含量 α unit content	1	0.031	0.031	75.09**	< 0.01
β 亚基含量 β unit content	1	0.032	0.032	54.09**	< 0.01
A3 亚基含量 A3 unit content	1	0.04	0.04	6.92	0.09
AS 亚基含量 AS unit content	1	0.095	0.095	185.81**	< 0.01
BS 亚基含量 BS unit content	1	0.371	0.371	338.11**	< 0.01
A5 亚基含量 A5 unit content	1	0.002	0.002	2.828	0.093

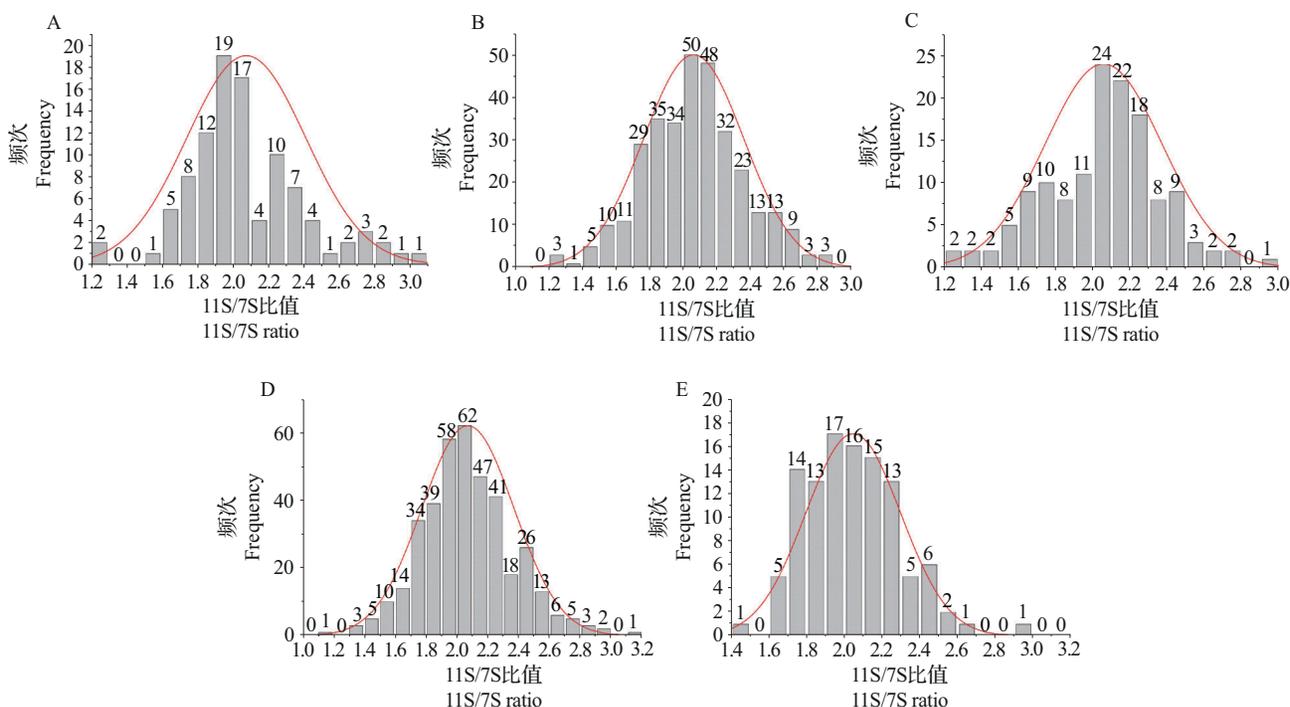
** : 在 $P < 0.01$ 水平上存在极显著差异,下同

** : Significant different at $P < 0.01$ probability level, the same as below

表4 地方与选育大豆贮藏蛋白 11S/7S 比值的变异分析

Table 4 Variation analysis of 11S/7S ratio of storage protein in landrace and cultivar soybean

材料类型 Material type	数量 Number	变幅 Range	平均值 Mean	变异系数(%) CV
地方品种 Landrace varieties	223	1.20~3.01	2.11	14.6
选育品种 Cultivar varieties	569	1.35~3.19	2.06	13.1
总体 Total	792	1.20~3.19	2.08	13.7



A: 中国华北地区; B: 中国东北地区; C: 中国黄淮地区; D: 中国华南地区; E: 国外地区

A : North China ; B : Northeast China ; C : The Huang-huai area of China ; D : South China ; E : Foreign area

图5 不同地区大豆种质资源 11S/7S 比值频次分布

Fig. 5 11S/7S ratio frequency distribution map of soybean germplasm resources in different regions

为进一步研究国内不同省份的大豆之间的差异,统计分析了不同省份大豆种质资源 11S/7S 比值的平均数和中位数(表5),并绘制了不同种质资源地理来源分布图(图6),27个省份中,来自湖北和贵州的大豆 11S/7S 比值为 1~2 的样品数量约为本省所

测大豆品种数量的 50%, 11S/7S 比值大于 3 的分别来自福建、北京。同时,由表 5 可知,目前我国不同省份的大豆品种的 11S/7S 比值普遍维持在 2 左右,表明不同省份的大豆品种 11S/7S 蛋白比值存在一定差异,但其对大豆 11S/7S 比值影响较小。

表5 不同省份来源 11S/7S 比值分析

Table 5 Analysis of 11S/7S ratios from different geographical sources

序号 No.	省份 Province	数量 Number	平均数 Average	中位数 Median	序号 No.	省份 Province	数量 Number	平均数 Average	中位数 Median
1	安徽	25	2.133	2.112	7	贵州	36	2.084	2.018
2	北京	21	2.087	2.025	8	河北	69	2.011	2.014
3	福建	24	2.076	2.020	9	河南	7	1.966	2.012
4	甘肃	9	1.886	1.937	10	黑龙江	113	2.083	2.090
5	广东	2	1.894	2.000	11	湖北	73	2.016	2.160
6	广西	7	1.992	1.989	12	湖南	47	2.155	2.093

表6 (续)

性状 Traits	11S/7S 比值 11S/7S ratio	α' 亚基 含量 α' unit content	α 亚基 含量 α unit content	β 亚基 含量 β unit content	A3亚基 含量 A3 unit content	AS亚基 含量 AS unit content	BS亚基 含量 BS unit content	A5亚基 含量 A5 unit content	总7S含量 总7S含量 7S content	总11S 含量 11S content	蛋白质 含量 Protein content	油分 含量 Oil content
A3亚基含量 A3 unit content	0.37**	-0.21**	-0.28**	-0.11**	1							
AS亚基含量 AS unit content	0.76**	0.70**	0.18**	-0.34**	-0.32**	1						
BS亚基含量 BS unit content	0.33**	-0.27**	-0.19**	-0.13**	-0.28**	-0.67**	1					
A5亚基含量 A5 unit content	0.42**	-0.19**	-0.33**	-0.17**	0.17	-0.23**	-0.34**	1				
总7S含量 7S content	-0.99**	0.53**	0.56**	0.55**	-0.36**	-0.95*	-0.35**	-0.41**	1			
总11S含量 11S content	0.99**	-0.53**	-0.56**	-0.55**	0.36**	0.95**	0.35**	0.41**	-1.00**	1		
蛋白质含量 Protein content	-0.43	0.34	0.35	0.35	-0.28	0.52	-0.26	-0.61	0.63	-0.63	1	
油分含量 Oil content	0.36	0.17	-0.13	-0.34	-0.20	0.13	0.26	0.26	0.10	-0.10	-0.86**	1

: 在 $P < 0.05$ 水平上差异显著: Significant different at $P < 0.05$ probability level

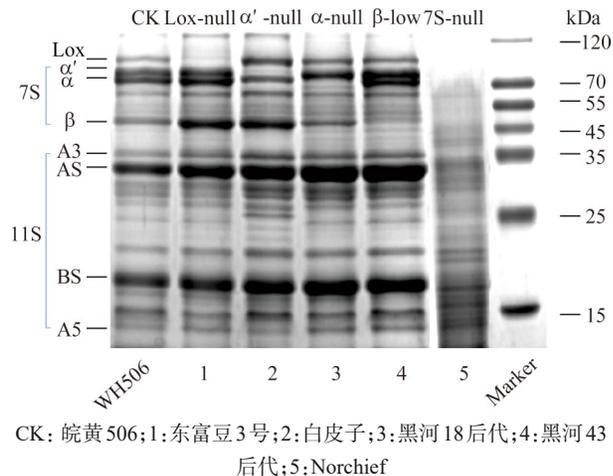
表7 鉴定出部分优异大豆种质

Table 7 The list of screened elite soybean germplasm

序号 No.	名称 Name	表型 Phenotypes	来源 Origin region	11S/7S 比值 11S/7S ratio
1	YJ012348	11s/7s 高	国外资源	3.10
2	吉农41	11s/7s 高	国内资源	3.07
3	房山黄豆	11s/7s 高	国内资源	3.01
4	Trisomic C	11s/7s 高	国外资源	3.19
5	小黄珠	11s/7s 高且 Lox 缺失	国内资源	3.15
6	小粒青	Lox 缺失	国内资源	2.09
7	HN3H-11	Lox 缺失	国内资源	2.31
8	红大丐豆	Lox 缺失	国内资源	2.48
9	汾豆5号	Lox 缺失	国内资源	1.95
10	东富豆3号	Lox 缺失	国内资源	1.54
11	白皮子	α' 缺失	国内资源	2.62
12	Norchief	7S 缺失	国外资源	—
13	黑河18后代	α 缺失	人工创制	3.35
14	克17-367后代	α 缺失	人工创制	2.60
15	黑河43后代	β 缺失	人工创制	3.25

—: Norchief 为 7S 各亚基均缺失, 无法计算 11S/7S 比值

—: Norchief was all 7S subunits losted, resulting it impossible to calculate the 11S/7S ratio



CK: 皖黄506; 1: 东富豆3号; 2: 白皮子; 3: 黑河18后代; 4: 黑河43后代; 5: Norchief

CK: Wanhuan 506 ; 1: Dongfudou 3 ; 2: White skin ; 3: Heihe 18 descendants ; 4: Heihe 43 offspring ; 5: Norchief

图7 亚基缺失的大豆种子贮藏蛋白电泳图谱

Fig.7 Electrophoretic map of soybean seed storage protein with subunit deletion

3 讨论

3.1 大豆蛋白亚基检测方法的优化

本研究对样品用量及处理方式进行了优化,确定了最优样品用量及处理方式。优化前的样品用量5 mg,优化后为1 mg,保证了大豆自身的发芽能力的同时,提高了材料利用率;在处理方式上减少了水浴加热10 min这一步骤,查阅多篇文献,对于蛋白样品加热与不加热的处理的方式各占一半^[16,18]。曾剑华等^[18]表示在热处理过程中11S球蛋白会发生解离缔合反应,说明在蛋白样品处理时,不做加热处理可以极大的保证11S球蛋白各亚基在凝胶电泳过程中分离的准确性,本研究也证明减少水浴10 min这一步骤可以使11S球蛋白的A3亚基更加显现,节省了制作样品的时间,提高了试验效率。

3.2 影响大豆贮藏蛋白各亚基含量的因素

徐豹等^[19]认为11S/7S比值与栽培区域的生态条件有明显的关系,在短日照、高温和降水较多的南方地区,11S/7S比值较小,而在北方地区11S/7S比值较高。王林林等^[20]利用微核心种质,得出南方大豆11S/7S比值平均值远远高于北方春大豆的结论。这可能是由于选用的大豆类型不一样,徐豹等^[19]是以野生大豆为试验对象,王林林等^[20]是以栽培大豆为试验对象。本研究的试验材料包含野生大豆和栽培大豆,研究表明南方大豆的11S/7S比值高于北方大豆11S/7S比值。国内外不同学者^[8,13,16,19]曾经对蛋白质组分做过SDS-PAGE分析,

且所分析材料多局限于部分地区的个别品种,缺乏代表性,参考价值受到限制。本研究分析了更广范围的不同地理来源的大豆11S/7S比值,发现相对于地理来源背景,种植环境对大豆11S/7S比值影响更大。王丽侠等^[21]通过地方品种与育成品种的比较,发现同一生态区或同一省份地方品种11S/7S比值平均值显著高于育成品种。与王丽侠等^[21]研究结果不同,本研究选育品种11S/7S比值最大值高于地方品种,说明选育品种在驯化的过程中,在提高大豆高产抗病的同时也改良了大豆加工品质特性。从11S/7S比值变异系数上看,地方品种的变异系数大于选育品种,说明地方品种变异类型更加丰富,与刘春等^[13]研究结果一致。

胡勇等^[22]对大豆蛋白质含量、油分含量进行分析发现,品系的蛋白质含量越高,其油分含量就越低,这与本研究中大豆蛋白质含量与油分含量之间呈极显著负相关一致。姜振峰^[23]、王燕平等^[24]研究认为大豆贮藏蛋白11S和7S球蛋白组分间、构成各组分亚基间和各组分和亚基之间都存在着相关关系,与本研究中11S和7S球蛋白组分之间呈负相关的结论一致,说明可以通过提高11S球蛋白的含量从而降低7S球蛋白的相对含量,改善大豆贮藏蛋白的营养价值。本研究11S/7S比值与蛋白质含量、油分含量均没有显著相关性,此结论与姜振峰^[23]的结论一致,说明高品质与优异蛋白大豆品种选育二者不矛盾,在选育高11S/7S比值大豆品种的同时,不影响其他品质性状。

3.3 优异种质资源的育种和加工利用途径

据郭顺堂等^[25]研究报告,豆腐得率与粗蛋白含量、可溶性蛋白含量呈显著正相关,豆腐的弹性与脂肪含量呈显著正相关,11S/7S比值与豆腐的硬度和弹性呈显著正相关,彭任文等^[26]研究也证明了这一点。本研究参照郭顺堂等^[25]对大豆不同11S/7S比值适合制作的豆腐分类,11S/7S比值小于1.8的大豆种质适合制作软质豆腐,比值在1.8~2.4的大豆种质适合制作硬质豆腐。郭方亮等^[27]将筛选出的11S/7S比值高于3.0的种质,以之为亲本进行有性杂交,从F₂分离群体中,筛选出了3份11S/7S比值高于3.4的种质。本研究发现了5份11S/7S比值高于3.0的材料,其中4份为11S/7S比值高于3.0且无亚基结构变异的材料,为大豆品种的选育工作提供了基础材料,拓宽了我国蛋白质组分改良育种的种质基础。

11S和7S组分之间存在营养品质和功能特性

差异,主要是因为组成的亚基不同,并且各亚基含量也存在差异,所以球蛋白的亚基组成和含量直接影响球蛋白的营养品质和功能特性^[28-29]。大部分研究者认为大豆种子7S球蛋白具有高乳化性,适用于豆浆、豆乳等制作,11S球蛋白具有高凝胶性,比较适用于豆腐加工等^[30-31]。因此,筛选获得的特异种质可为我国大豆蛋白的开发和品质改良提供优良的基因型。本研究共筛选出15份大豆优异种质资源,与传统大豆相比,Lox缺失型大豆表现为低或无腥味,更迎合人们膳食喜爱。目前我国利用转育方法已培育出五星一号、绥无腥豆1号等无腥味大豆品种^[32-33]。 α' 亚基、 α 亚基和 β 亚基被认为是主要的大豆过敏原,该亚基缺失可以降低大豆的致敏性,相比其他品种,7S球蛋白各亚基缺失的大豆种质更适合于豆制品的加工。本研究通过对已有种质的筛选,挖掘出大豆种质中优异的亚基缺失种质共11份和高11S/7S比值种质5份,可为大豆蛋白品质育种和蛋白基因遗传效应等研究提供优异的遗传资源。

参考文献

- [1] Shu X O, Jin F, Dai Q, Wen W, Potter J D, Kushi L H, Ruan Z, Gao Y T, Zheng W. Soyfood intake during adolescence and sub-sequent risk of breast cancer among Chinese women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2001, 10: 483-488
- [2] Tsuruki T, Takahata K, Yoshikawa M. Anti-alopecia mechanisms of soymetide-4, an immunostimulating peptide derived from soy β -conglycinin. *Peptides*, 2005, 26: 707-711
- [3] Wang B, Teng D, Yu C, Yao L, Ma X, Wu T. Increased sulfur-containing amino acid content and altered conformational characteristics of soybean proteins by rebalancing 11S and 7S compositions. *Frontiers in Plant Science*. 2022, 13: 828153
- [4] 黄丽华. 大豆种质贮藏蛋白11S和7S组分的变异以及与功能性关系的研究. 长沙: 湖南农业大学, 2003
Huang L H. Study on the variation of 11S and 7S components of soybean storage protein and their functional relationship. Changsha: Hunan Agricultural University, 2003
- [5] Fu H, Shan D, Li J, Swallah M S, Yang X, Ji L, Wang S, Gong H, Lyu B, Yu H. Potential functionality of β -conglycinin with subunit deficiencies: Soy protein may regulate glucose and lipid metabolism. *Food & Function*, 2022, 13 (23): 12291-12302
- [6] Adams M R, Golden D L, Franke A A, Potter S M, Smith H S, Anthony M S. Dietary soy beta-conglycinin (7S globulin) inhibits atherosclerosis in mice. *The Journal of Nutrition*, 2004, 134(3): 511-516
- [7] 周新安, 盖钧镒, 马育华. 大豆种子贮藏蛋白组成及其相关分析. *大豆科学*, 1992, 11(3): 191-197
Zhou X A, Gai J Y, Ma Y H. Composition and correlation analysis of soybean seed storage protein. *Soybean Science*, 1992, 11(3): 191-197
- [8] 刘香英, 康立宁, 田志刚, 张井勇, 杨春明, 王景会, 姜媛媛, 张莉. 东北大豆品种贮藏蛋白7S和11S组分及其亚基相对含量分析. *大豆科学*, 2009, 28(6): 985-989
Liu X Y, Kang L N, Tian Z G, Zhang J Y, Yang C M, Wang J H, Jiang Y Y, Zhang L. Analysis of storage protein 7S and 11S components and their subunits relative content of soybean varieties in Northeast China. *Soybean Science*, 2009, 28(6): 985-989
- [9] Cai T, Chang K C. Processing effect on soybean storage proteins and their relationship with tofu quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(2): 720-727
- [10] 唐传核, 彭志英. 大豆功能性成分的开发现状. *中国油脂*, 2000, 25(4): 44-47
Tang C H, Peng Z Y. Development status of soybean functional components. *China Oils and Fats*, 2000, 25(4): 44-47
- [11] Zhang S, Du H, Ma Y, Li H, Kan G, Yu D. Linkage and association study discovered loci and candidate genes for glycinin and β -conglycinin in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2021, 134(4): 1201-1215
- [12] 杨慧, 陈红兵, 程伟, 高金燕, 李欣. 大豆主要过敏原及其脱敏方法的研究进展. *食品科学*, 2011, 32(21): 273-277
Yang H, Chen H B, Cheng W, Gao J Y, Li X. Research progress on main soybean allergens and their desensitization methods. *Food Science*, 2011, 32(21): 273-277
- [13] 刘春, 王显生, 张占琴, 高文瑞, 麻浩. 大豆种子贮藏蛋白亚基含量变异种质的筛选与创制. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2008(3): 249-255
Liu C, Wang X S, Zhang Z Q, Gao W R, Ma H. Screening and creation of soybean seed storage protein subunit content variation germplasm. Hunan Agricultural University: Science Edition, 2008(3): 249-255
- [14] Stanojevic S P, Barac M B, Pesic M B, Vucelic-Radovic B V. Assessment of soy genotype and processing method on quality of soybean tofu. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(13): 7368-7376
- [15] Boehm J J, Nguyen V, Tashiro R M, Anderson D, Shi C, Wu X, Woodrow L, Yu K, Cui Y, Li Z. Genetic mapping and validation of the loci controlling 7S α' and 11S A-type storage protein subunits in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2018, 131(3): 659-671
- [16] 张国敏, 张亚琴, 舒英杰, 麻浩. 三种大豆种子贮藏蛋白亚基缺失种质的筛选与鉴定. *大豆科学*, 2015, 34(1): 1-8, 31
Zhang G M, Zhang Y Q, Shu Y J, Ma H. Screening and identification of three soybean seed storage protein subunit deletion germplasm. *Soybean Science*, 2015, 34(1): 1-8, 31
- [17] 张明俊, 邱丽娟. 大豆籽粒贮藏蛋白7S和11S组分及其亚基相对含量分析//中国作物学会大豆专业委员会. 第十届全国

- 大豆学术讨论会论文摘要集.北京:中国作物学会,2017:26
- Zhang M J, Qiu L J. Analysis of the relative contents of 7S and 11S components and their subunits of storage proteins in soybean seeds//Soybean Professional Committee of Chinese Crop Society. Abstracts of the Tenth National Soybean Symposium. Beijing: The Crop Science Society of China, 2017:26
- [18] 曾剑华, 杨杨, 刘琳琳, 石彦国, 张娜, 朱秀清. 热处理过程中大豆 11S 球蛋白解离缔合行为研究进展. 食品科学, 2019, 40(11): 303-312
- Zeng J H, Yang Y, Liu L L, Shi Y G, Zhang N, Zhu X Q. Research progress on dissociation and association behavior of soybean 11S globulin during heat treatment. Food Science. 2019, 40(11):303-312
- [19] 徐豹, 邹淑华, 庄炳昌, 林忠平, 赵玉锦. 野生大豆(*G. soja*)种子贮藏蛋白组份 11S/7S 的研究. 作物学报, 1990, 16(3): 235-241
- Xu B, Zhou S H, Zhuang B C, Lin Z P, Zhao Y J. Study on storage protein components 11S/7S of wild soybean seeds. Acta Agronomica Sinica, 1990, 16(3): 235-241
- [20] 王林林, 关荣霞, 齐峥, 邱丽娟, 罗淑萍. 大豆微核心种质与育成品种的种子蛋白 11S/7S 比值的分析. 植物遗传资源学报, 2008, 9(1): 68-72
- Wang L L, Guan R X, Qi Z, Qiu L J, Luo S P. Analysis of 11S/7S ratio of seed protein in soybean mini core collection and bred varieties. Journal of Plant Genetic Resources, 2008, 9(1): 68-72
- [21] 王丽侠, 郭顺堂, 付翠真, 关荣霞, 张其属, 常汝镇, 邱丽娟. 大豆种子贮藏蛋白 11S 与 7S 组份的研究. 中国粮油学报, 2004, 19(4): 53-57
- Wang L X, Guo S T, Fu C Z, Guan R X, Zhang Q S, Chang R Z, Qiu L J. Study on 11S and 7S components of soybean seed storage protein. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2004, 19(4): 53-57
- [22] 胡勇, 宣文良, 王希春. 大豆蛋白与油分和百粒重的相关性分析. 现代农业科技, 2017(18): 3-4
- Hu Y, Xuan W L, Wang X C. Correlation analysis of soybean protein with oil content and 100-seed weight. Modern Agricultural Science and Technology, 2017(18): 3-4
- [23] 姜振峰. 大豆贮藏蛋白亚基资源分析及年份地点变异研究. 哈尔滨: 东北农业大学, 2003
- Jiang Z F. Analysis of soybean storage protein subunit resources and study on year and location variation. Haerbin: Northeast Agricultural University, 2003
- [24] 王燕平, 王鹏, 郭玮, 赵晶, 李贵全. 大豆贮藏蛋白 11S 和 7S 组分及其亚基相对含量的研究. 中国粮油学报, 2010, 25(8): 15-18
- Wang Y P, Wang P, Guo W, Zhao J, Li G Q. Study on the relative content of 11S and 7S components and subunits of soybean storage protein. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2010, 25(8): 15-18
- [25] 郭顺堂, 谢来超, 张新艳. 原料大豆豆腐加工适用性评价方法的建立. 大豆科技, 2013, 124(3): 20-21
- Guo S T, Xie L C, Zhang X Y. Establishment of applicability evaluation method for raw soybean tofu processing. Soybean Science & Technology, 2013, 124(3): 20-21
- [26] 彭任文, 陈健, 胡金海, 杜楠琳, 邱红梅, 陈亮, 王跃强. 大豆蛋白亚基组成对豆腐产量和品质的影响研究. 种子, 2023, 42(1): 84-90
- Peng R W, Chen J, Hu J H, Du N L, Qiu H M, Chen L, Wang Y Q. Study on the effect of soybean protein subunit composition on the tofuyield and quality. Seed, 2023, 42(1): 84-90
- [27] 郭方亮, 张智勇, 张倩雪, 包雪莲, 周祎, 刘涵森, 叶英杰. 大豆球蛋白高 11S/7S 比值种质创新. 种子科技, 2023, 41(6): 11-13, 17
- Guo F L, Zhang Z Y, Zhang Q X, Bao X L, Zhou Y, Liu H M, Ye Y J. Germplasm innovation of high 11S/7S ratio of soybean globulin. Seed Science & Technology, 2023, 41(6): 11-13, 17
- [28] 冯建岭, 彭云婷, 李迎秋. 大豆分离蛋白的功能特性及应用. 粮食与食品工业, 2017, 24(6): 37-40
- Feng J L, Peng Y T, Li Y Q. Functional properties and applications of soy protein isolate. Cereal & Food Industry, 2017, 24(6): 37-40
- [29] Singh A, Meena M, Kumar D, Dubey A K, Hassan M I. Structural and functional analysis of various globulin proteins from soy seed. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2015, 55(11): 1491-1502
- [30] Stanojevic S P, Barac M B, Pesic M B, Vučelic-Radovic B V. Assessment of soy genotype and processing method on quality of soybean tofu. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(13): 7368-7376
- [31] 吕博, 孙贺, 于寒松. 大豆中 11S 球蛋白的不同亚基与分离蛋白凝胶特性关系的研究. 粮食与油脂, 2021, 34(2): 59-62
- Lv B, Sun H, Yu H S. Relationship between different protein subunits of 11S globulin and gel properties of soybean protein isolated. Cereals & Oils, 2021, 34(2): 59-62
- [32] 刘燕, 张平, 朱秀清, 邵弘. 大豆脂肪氧化酶缺失型材料的获得和应用. 大豆通报, 2003(6): 19
- Liu Y, Zhang P, Zhu X Q, Shao H. The acquisition and application of soybean lipoxygenase-deficient materials. Soybean Science & Technology, 2003(6): 19
- [33] 王文秀, 张孟臣. 无腥大豆种质创高产和品种选育. 大豆科学, 2002, 21(2): 154
- Wang W X, Zhang M C. High yield and variety breeding of odorless soybean germplasm. Soybean Science, 2002, 21(2): 154