

湖北省优质杂交稻品种贮藏蛋白的比较研究

何莹¹, 邵锦震¹, 余夏夏¹, 王前和², 朱伯华², 丁毅^{1*}

(1. 武汉大学生命科学学院, 植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072; 2. 武汉市种子管理站, 武汉 430022)

摘要: 研究选取水稻品种共 20 个, 其中包括湖北省近两年审定的优质杂交水稻品种 10 个(‘鄂早 17’、‘鄂早 18’、‘两优 1193’、‘武香 880’、‘岳优 26’、‘宜优 99’、‘协优 96’、‘鄂晚 12’、‘鄂中 5 号’、‘两优 277’)以及 7 个普通杂交水稻(‘G98-202’、‘578’、‘两优 637’、‘宜优 22’、‘3685’、‘3089’、‘加育 948’)和国家审定的优质水稻品种 3 个(‘嘉育 948’、‘两优 932’、‘舟 903’), 采用不连续的 SDS-PAGE 电泳分析种子贮藏蛋白, 结果在谷蛋白中主要分离出 57 kD 的蛋白前体、37 ~ 39 kD 的酸性亚基和 22 ~ 23 kD 的碱性亚基。同时, 选取品种‘3089’、‘嘉育 948’、‘537’、‘舟 903’和‘两优 932’, 利用高效液相色谱法分析了种子贮藏蛋白中的谷蛋白亚基的含量。结果表明, 水稻谷蛋白亚基含量的多少可以作为评价品种营养品质优劣的参考依据之一。

关键词: 谷蛋白; 醇溶蛋白; SDS-PAGE; 高效液相色谱; 水稻

中图分类号: Q512^{+.4}; S511

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)03-0270-07

Study on Storage Protein of High Quality Hybrid Rice in Hubei Province

HE Ying¹, SHAO Jin-Zhen¹, YU Xia-Xia¹, WANG Qian-He², ZHU Bo-Hua², DING Yi^{1*}

(1. Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China;

2. Wuhan Seed Management Station, Wuhan 430022, China)

Abstract: Twenty cultivars of hybrid rice were chosen in this study, of which including ten cultivars of high quality hybrid rice (‘Ezao 17’, ‘Ezao 18’, ‘Liangyou 1193’, ‘Wuxiang 880’, ‘Yueyou 26’, ‘Yiyou 99’, ‘Xieyou 96’, ‘Ewan 12’, ‘Ezhong 5’, ‘Liangyou 277’) identified by Hubei Province in two years and seven ones of general hybrid rice (‘G98-202’, ‘578’, ‘Liangyou 637’, ‘Yiyou 22’, ‘3685’, ‘3089’, ‘JY 948’), and three kinds of high quality hybrid rice which have passed the national identification (‘Jiayu 948’, ‘Liangyou 932’, ‘Zhou 903’) as control. Using discontinuous SDS-PAGE, the storage glutelin of rice seeds were separated into a 57 kD precursor, a 37 ~ 39 kD acidic subunit and a 22 ~ 23 kD basic subunit. Five kinds of hybrid rice ‘3089’, ‘Jiayu 948’, ‘537’, ‘Zhou 903’ and ‘Liangyou 932’ were chosen to analyze the content of the glutelin subunit by HPLC (high performance liquid chromatography). The results showed that the content of the glutelin subunit could be regarded as a standard of distinguishing between high and low quality rice.

Key words: Glutelin; Prolamine; SDS-PAGE; HPLC; Rice (*Oryza sativa* L.)

水稻是世界上重要的农作物之一。其贮藏蛋白主要存在于胚乳, 按照其溶解度不同可以分为四类: 清蛋白 (Albumin)、球蛋白 (Globulin)、醇溶蛋白 (Prolamin) 和谷蛋白 (Glutelin)^[1,2]。水稻成熟种子中贮藏蛋白以谷蛋白为主, 谷蛋白含量约为胚乳蛋白总量的 60% ~ 80%, 而另一主要贮藏蛋白是醇溶蛋白, 约占 18% ~ 20%^[3]。

种子贮藏蛋白定位于蛋白体 (protein body, 简称 PB)。水稻胚乳中存在两种蛋白体 (PB-I, PB-II), 主要富集于亚糊粉层而很少位于稻米粒的中心区

域。在结构上, PB-I 是具有片层结构的球体, 直径约 1 ~ 2 μm ; PB-II 是形状不规则的复合物, 直径 2 ~ 3 μm ^[4]。Tanaka^[5]通过酶切和 SDS-PAGE 检测出水稻两种蛋白体, PB-I 和 PB-II, 其中 PB-II 由分子量为 22、37、38、39 kD 的多肽组成。两种蛋白体经过溶解度分步分离确定, 22、37、38、39、57 kD 多肽为谷蛋白, 13 kD 为醇溶蛋白, 10、16、26 kD 为球蛋白。Ogawa 在 1987 年成功分离并纯化 PB-I。SDS-PAGE 分析显示 PB-I 中含有多组多肽链, 含量最大的一组是 13 kD, 含量较小的两组是 10 kD 和 16 kD。

收稿日期: 2006-11-07, 修回日期: 2007-02-12。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30571143); 湖北省科技攻关项目 (2006AA201C04); 武汉市科技攻关计划项目 (20062002043)。

作者简介: 何莹 (1982-), 女, 硕士, 专业方向为遗传学 (E-mail: 7736251@qq.com)。

* 通讯作者 (E-mail: yiding@whu.edu.cn)。

研究表明,水稻谷蛋白首先以 57 kD 前体的形式合成,经过蛋白质限制性水解,裂解为成熟的酸性(α -)亚基和碱性(β -)亚基,两者以二硫键(S-S)连接在一起,贮藏于 PB-II 中^[6]。通过 SDS-PAGE 分析,谷蛋白酸性亚基和碱性亚基分别分离为: α -1 (39 kD)、 α -2 (38 kD)、 α -3 (37 kD) 和 β -1 (23 kD)、 β -2 (22.5 kD)、 β -3 (22 kD)^[7]。

研究还表明,醇溶蛋白的含量和稻米粗蛋白的含量显著相关,但由于其包含于坚实的 PB-I 中,不易被胃蛋白酶消化,因而降低了其营养价值^[8]。PB-II 能被人胃蛋白酶降解,而 PB-I 不能被消化^[5]。PB-II 是谷蛋白储存体,所以鉴定水稻营养品质优劣,可用谷蛋白的多少作为一个参考标准。我们拟利用水稻种子贮藏蛋白特别是谷蛋白作为鉴

别和评价品种营养品质优劣的参考依据之一,现将有关实验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

选取水稻(*Oryza sativa* L.) 品种共 20 个(见表 1),其中‘鄂早 17’、‘鄂早 18’、‘两优 1193’、‘武香 880’、‘岳优 26’、‘宜优 99’、‘协优 96’和‘鄂晚 12’等 8 个品种为 2003 年通过湖北省农作物品种审定委员会审定的品种;‘鄂中 5 号’和‘两优 277’为 2004 年通过湖北省农作物品种审定委员会审定的品种;‘嘉育 948’、‘两优 932’和‘舟 903’是通过了国家农作物品种审定委员会审定的品种。所有供试水稻品种均由有关选育单位友好提供(见表 1)。

表 1 材料来源
Table 1 Source of materials

品种名称 Varieties	品种来源 Origination	选育单位 Places	品质 Species	审定编号 Sample No.
‘鄂早 17’ ‘Ezao 17’ (原代号:‘5216’)	‘中优早 3 号’/‘湖大 51 号’// ‘早熟 1 号’	湖北大学	中熟偏迟粳型早稻	鄂审稻 001-2003
‘鄂早 18’ ‘Ezao 18’	‘中早 81’/‘嘉早 935’	黄冈市农业科学研究所 湖北省种子集团公司	迟熟粳型早稻	鄂审稻 002-2003
‘两优 1193’ ‘Liangyou 1193’	‘1103S’/‘810093’	武汉大学	中稻	鄂审稻 005-2003
‘武香 880’ ‘Wuxiang 880’	‘武香 A’/‘880’	武汉大学 广东省农业科学院水稻研究所	中熟偏迟粳型晚稻	鄂审稻 006-2003
‘岳优 26’ ‘Yueyou 26’	‘岳 4A’/‘咸恢 26’	咸宁市农业科学研究所	中熟偏迟粳型晚稻	鄂审稻 007-2003
‘宜优 99’ ‘Yiyou 99’	‘宜陵 1A’/‘桂 99’	宜昌市农业科学研究所	中熟偏迟粳型晚稻	鄂审稻 008-2003
‘协优 96’ ‘Xieyou 96’	‘协青早 A’/‘R96’	大冶市农业科学研究所 荆州市种子总公司	中熟粳型晚稻	鄂审稻 010-2003
‘鄂晚 12’ ‘Ewan 12’ (原代号:‘96805’)	‘8802’/‘筑紫晴’	黄冈市农业科学研究所	中熟晚稻	鄂审稻 011-2003
‘鄂中 5 号’ ‘Ezhong 5’ (‘润珠 537’)	西班牙引进的水稻种子变异单株	湖北省农科院作物育种栽培研究所 湖北省优质水稻研究开发中心	中稻	鄂审稻 2004010
‘两优 277’ ‘Liangyou 277’ (原代号:‘Y620’)	‘YW-2S’/‘双七’	湖北省农科院作物育种栽培研究所	中迟熟粳型晚稻	鄂审稻 2004012
‘嘉育 948’ ‘Jiayu 948’	‘YD4-4’/‘嘉育 293-T8’	浙江省嘉兴市农业科学院	早粳	国审稻 2001018
‘两优 932’ ‘Liangyou 932’	‘W9593S’/‘胜优 2 号’	湖北省农科院作物育种栽培研究所	-	国审稻 2003053
‘舟 903’ ‘Zhou 903’	‘红突 80’/‘电 412’	浙江省舟山市农科所	-	国审稻 2001017
‘两优 637’ ‘Liangyou 637’	-	湖北省农科院提供	-	杂交水稻
‘宜优 22’ ‘Yiyou 22’	-	湖北省农科院提供	-	杂交水稻
‘3685’	-	湖北省农科院提供	-	杂交水稻
‘C98-202’	-	湖北省农科院提供	-	杂交水稻
‘3089’	-	湖北省农科院提供	-	杂交水稻
‘578’	-	湖北省农科院提供	-	杂交水稻
‘加育 948’ ‘JY 948’	-	湖北省农科院提供	-	杂交水稻

1.2 方法

1.2.1 全蛋白的提取 参照 Masako^[9] 的方法稍有改进。将种子先剥去颖壳,除胚后砸碎成粉状后37℃干燥数日,称取0.02 g,加入1 mL的全蛋白提取液(0.125 mol/L Tris-HCl pH 6.8,4% SDS,4 mol/L 尿素,5% 2-巯基乙醇),220 r/min 37℃离心10 min,振荡过夜。

1.2.2 清-球蛋白的提取 参照Masako^[9] 的方法稍有改进。称取0.2 g种子粉状物,加入15 mL的提取液[0.5 mol/L NaCl,10 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8)],超声波破碎,按每10 s停5 s共18次,12 000 r/min离心15 min,重复3次,收集上清,用超滤管浓缩。沉淀用于谷蛋白和醇溶蛋白提取。全过程在冰上进行。

1.2.3 醇溶蛋白的提取 参照 Kumamaru^[10] 的方法稍有改进。用dH₂O三次清洗从1.2.2中获得的沉淀,加入70%乙醇2 mL,37℃温浴30 min,10 000 r/min离心5 min,反复3次,收集上清。上清用冰丙酮4℃下沉淀24 h,10 000 r/min离心15 min,去上清。沉淀为醇溶蛋白。

1.2.4 谷蛋白的提取 参照 Masako^[9] 的方法稍有改进。用dH₂O三次清洗从1.2.2中获得的沉淀,加入1%乳酸17 mL,超声波破碎方法同1.2.2。收集的上清分成两部分,一部分上清液用超滤管浓缩,得到谷蛋白溶液;另一部分上清液参照曲乐庆^[11] 的方法提取。用NaOH溶液中和来获得谷蛋白沉淀。全过程在冰上进行。

1.2.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳分析样品谷蛋白、醇溶蛋白和全蛋白。分离胶和浓缩胶浓度分别为15%和5%,电泳,考马斯亮蓝染色。操作方法参照《分子克隆实验指南》^[12]。

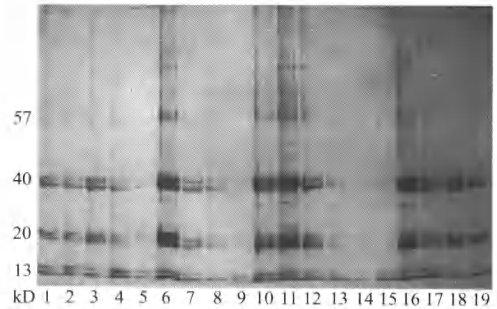
1.2.6 高效液相色谱(HPLC)分析 选取‘537’、‘嘉育948’、‘3089’(由湖北省农科院提供的分别代表特优、较优和优3个等级的杂交水稻)、“舟903”和“两优932”共5个样品进行实验。利用高效液相色谱法分析种子贮藏蛋白中的谷蛋白亚基含量。高效液相色谱仪为:Waters 2695型(美国Waters公司)。流动相K₂HPO₄、KH₂PO₄、乙腈。线形梯度,上样量10 μL,流速1 mL/min,运行时间17 min,柱温37℃。

2 研究结果

2.1 醇溶蛋白 SDS-PAGE 分析

从醇溶蛋白 SDS-PAGE 结果(见图1)看,19个品种的醇溶蛋白条带分布主要在57、40、20、13 kD

四个区域。其中57 kD条带是谷蛋白前体。谷蛋白的酸性(40 kD)和碱性(20 kD)亚基又分别由4条α带[α-1(39 kD)、α-2(38 kD)、α-3(37 kD)、α-4]和3条β带[β-1(23 kD)、β-2(22.5 kD)、β-3(22 kD)]组成。13 kD的醇溶蛋白分为13a和13b。这些结果和以前报道的结果是一致的^[5,9]。



1. ‘Jiayu 948’; 2. ‘Zhou 903’; 3. ‘Yueyou 26’; 4. ‘Yiyou 99’; 5. ‘3685’; 6. ‘Liangyou 1193’; 7. ‘Ezao 18’; 8. ‘G98-202’; 9. ‘Liangyou 637’; 10. ‘Liangyou 932’; 11. ‘578’; 12. ‘Liangyou 277’; 13. ‘Xieyou 96’; 14. ‘Ezhong 5’; 15. ‘Ezao 17’; 16. ‘Yiyou 22’; 17. ‘Ewan 12’; 18. ‘Wuxiang 880’; 19. ‘JY 948’

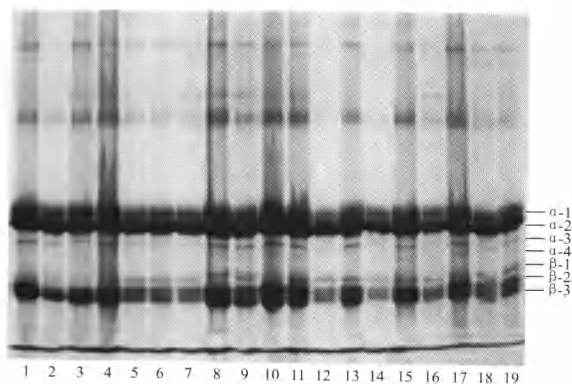
图1 醇溶蛋白 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 Prolamine bands of rice seeds with SDS-PAGE

从醇溶蛋白电泳结果(图1)看,‘G98-202’(泳道8)和‘鄂中5号’(泳道14)两个品种缺少13 kD条带,而其他品种都显示13 kD条带。但是该条带染色的深浅在不同品系中稍有不同。依据13 kD醇溶蛋白染色的深浅可将样品分为三组:第一组包括‘两优1193’、‘两优932’、‘578’、‘两优277’、‘宜优22’、‘鄂晚12’、‘武香880’和‘加育948’,该组醇溶蛋白条带染色最深;第二组包括‘嘉育948’、‘舟903’、‘岳优26’、‘宜优99’、‘3685’、‘鄂早18’、‘两优637’、‘协优96’和‘鄂早17’,该组染色次之;第三组包括‘G98-202’和‘鄂中5号’,该组染色最浅,或缺失。鉴于醇溶蛋白的提取过程相同,提取条件相同,而水稻种子贮藏蛋白中的醇溶蛋白大约仅占18%~20%^[3],用70%的乙醇提取种子醇溶蛋白在SDS-PAGE中电泳只有少量的谱带产生,因此可以认为水稻种子中的醇溶蛋白可能仅由少量几种大小不同的多肽分子组成。但是染色深浅有一定的差异性,这说明醇溶蛋白的含量在不同品种间可能存在显著的差异性。但是醇溶蛋白 SDS-PAGE 带型中在40、57 kD也有清晰条带,推测谷蛋白和醇溶蛋白有交叉区域。

2.2 谷蛋白 SDS-PAGE 分析

从谷蛋白 SDS-PAGE(图2)结果看,19个品种在57、40、20 kD处都有条带。其中57 kD条带是谷蛋白



图中序号注释见图1

Annotation of the serial number is the same as that in Fig. 1

图2 谷蛋白 SDS-PAGE 带型

Fig. 2 Glutelin bands of rice seeds with SDS-PAGE

前体。谷蛋白的酸性(40 kD)和碱性(20 kD)亚基又分别由4条 α 带和3条 β 带组成。 α -2(38 kD)是谷蛋白酸性亚基中染色最深、含量最多的部分; β -1(23 kD)是谷蛋白碱性亚基中染色最浅、含量最少的部分^[5,9]。由于贮藏蛋白中80%都是谷蛋白,条带变化主要在 α -3、 α -4和 β -1之间,其他 α 亚基和 β 亚基变化不明显;但是,从碱性亚基(β 亚基)的量上可以看出存在一定的差异。将这些条带差异统计后,用聚类程序将这些供试品种进行归类(图3)。

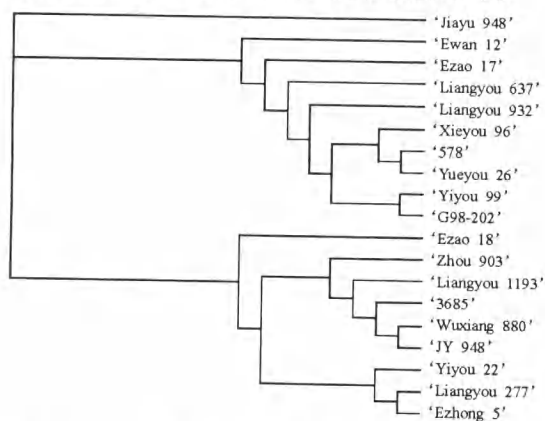


图3 19个水稻样品谷蛋白电泳条带的聚类分析结果

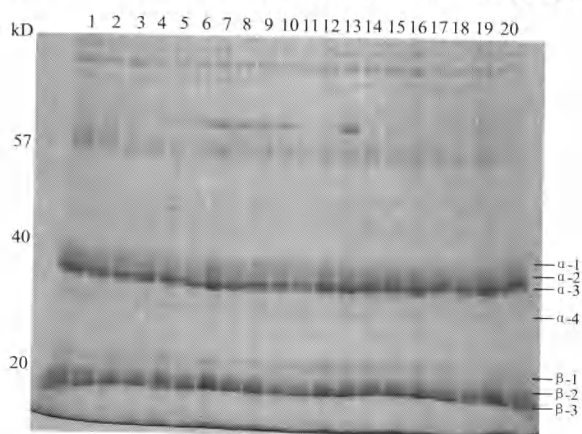
Fig. 3 Clustering result of glutelin bands of rice seeds with SDS-PAGE among nineteen cultivars of hybrid rice

从聚类分析结果(图3)可见样品可聚为三类:‘嘉育948’单独聚为一类;‘鄂晚12’、‘鄂早17’、‘两优637’、‘两优932’、‘协优96’、‘578’、‘岳优26’、‘宜优99’和‘G98-202’聚为一类;‘鄂早18’、‘舟903’、‘两优1193’、‘3685’、‘武香880’、‘加育948’、‘宜优22’、‘两优277’和‘537’(‘鄂中5号’)聚为第三类。这反映出供试水稻种子中谷蛋白组成的相似性程度。但利用 SDS-PAGE 图谱不足以判断

样品品质的优劣。若要建立谷蛋白的带型和特征带含量的差异与品质优劣之间的联系,尚需要进一步的研究。为此,我们以 SDS-PAGE 结果作为参考,进行了 HPLC 实验,以探求是否存在某种联系。

2.3 全蛋白和清蛋白-球蛋白 SDS-PAGE 分析

从全蛋白 SDS-PAGE 电泳结果(图4)看,20个品种在57、40、20 kD 都有条带出现。其中57 kD 条带是谷蛋白前体,谷蛋白的酸性和碱性亚基又分别由 α -1、 α -2、 α -3、 α -4(39~35 kD)等4条条带和 β -1、 β -2、 β -3(23~22 kD)等3条条带组成。由于贮藏蛋白中80%都是谷蛋白,全蛋白应包括所有条带,但是品种间变化只在 α -4、 β -2条带上有多态性,其他不明显。全蛋白提取液只能将水稻种子贮藏蛋白中含量最多的谷蛋白提取出来,由于其限制只能进行分步提取清蛋白-球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白。另一方面,全蛋白提取液提取蛋白有一定饱和度,由于待提取的蛋白大大超过全蛋白提取液所能溶解蛋白的能力,所以从图4看不出不同水稻种子贮藏蛋白含量的变化。



1. 'Ezao 17'; 2. 'Ezao 18'; 3. 'Ewan 12'; 4. 'Liangyou 1193'; 5. 'Liangyou 932'; 6. 'Liangyou 277'; 7. 'Liangyou 637'; 8. 'Xieyou 96'; 9. 'Yiyou 22'; 10. 'Yiyou 99'; 11. 'Yueyou 26'; 12. '537'; 13. '578'; 14. '5126'; 15. 'Zhou 903'; 16. 'G98-202'; 17. '3685'; 18. '2089'; 19. 'Jiayu 948'; 20. 'Wuxiang 880'

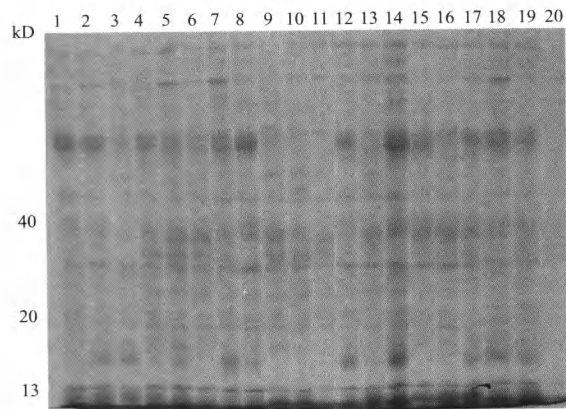
图4 全蛋白 SDS-PAGE 带型

Fig. 4 Total protein bands of rice seeds

从图5电泳结果看,20个品种在90、57、40、20、10 kD 都有条带,条带多达20条左右。其中不仅包含了水稻种子清蛋白和球蛋白,还有其他蛋白,主要是谷蛋白。品种间的多态性明显,还有量上的区别。

2.4 HPLC 结果及分析

选取5个样品:‘537’、‘嘉育948’、‘3089’(这3个样品是由湖北省农科院提供的3个等级的杂交水稻)、‘两优932’和‘舟903’,利用高效液相色谱法分析种子贮藏蛋白中的谷蛋白。采用高效液相色谱仪(型



图中序号注释见图4
Annotation of the serial number is the same as that in Fig. 4

图5 清蛋白-球蛋白 SDS-PAGE 带型
Fig. 5 Albumin-globulin bands of rice seeds

号: Waters 2695, 美国 Waters 公司), 流动相 K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和乙腈, 线形梯度, 上样量 10 μ L, 流速 1 mL/min, 运行时间 17 min, 柱温 37 $^{\circ}$ C。结果分别见图6、表2, 图7、表3, 图8、表4, 图9、表5, 图10、表6。

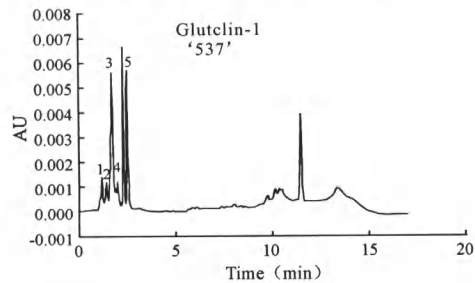


图6 ‘537’谷蛋白 HPLC 图谱
Fig. 6 HPLC map of glutelin of ‘537’

表2 ‘537’谷蛋白 HPLC 结果分析
Table 2 Analyzing HPLC map of glutelin of ‘537’

‘537’	Peak name	PT (min)	Area	Area(%)	Height (μ AU)
1	Peak 1	1.158	11171	7.89	1396
2	Peak 2	1.404	8105	5.72	1171
3	Peak 3	1.712	50673	35.78	5507
4	Peak 4	1.983	7801	5.51	1153
5		2.318	27473	19.40	6394
6	Peak 5	2.524	25865	18.26	5634

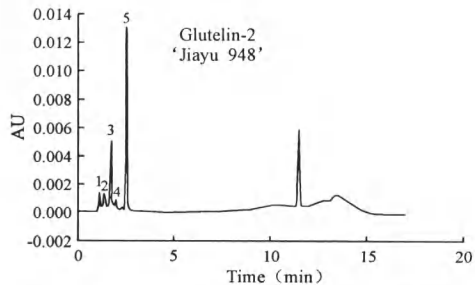


图7 ‘嘉育948’谷蛋白 HPLC 图谱
Fig. 7 HPLC map of glutelin of ‘Jiayu 948’

表3 ‘嘉育948’谷蛋白 HPLC 结果分析
Table 3 Analyzing HPLC map of glutelin of ‘Jiayu 948’

‘Jiayu 948’	Peak name	PT (min)	Area	Area(%)	Height (μ AU)
1	Peak 1	1.122	11373	9.79	1440
2	Peak 2	1.369	9111	7.84	1218
3	Peak 3	1.713	35729	30.76	4926
4	Peak 4	1.980	4246	3.66	780
5	Peak 5	2.523	55703	47.95	12788

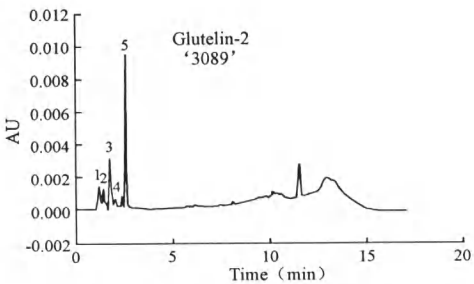


图8 ‘3089’谷蛋白 HPLC 图谱
Fig. 8 HPLC map of glutelin of ‘3089’

表4 ‘3089’谷蛋白 HPLC 结果分析
Table 4 Analyzing HPLC map of glutelin of ‘3089’

‘3089’	Peak name	PT (min)	Area	Area(%)	Height (μ AU)
1	Peak 1	1.114	12335	12.32	1487
2	Peak 2	1.358	12661	12.65	1395
3	Peak 3	1.691	26857	26.83	3251
4	Peak 4	1.972	3793	3.79	635
5		2.312	3590	3.59	799
6	Peak 5	2.522	40846	40.81	9274

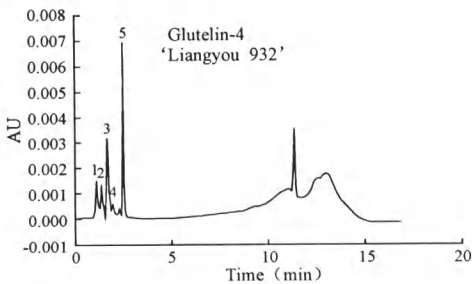


图9 ‘两优932’谷蛋白 HPLC 图谱
Fig. 9 HPLC map of glutelin of ‘Liangyou 932’

表5 ‘两优932’谷蛋白 HPLC 结果分析
Table 5 Analyzing HPLC map of glutelin of ‘Liangyou 932’

‘Liangyou 932’	Peak name	PT (min)	Area	Area(%)	Height (μ AU)
1	Peak 1	1.117	12714	14.72	1526
2	Peak 2	1.364	11844	13.71	1424
3	Peak 3	1.687	26496	30.68	3265
4	Peak 4	1.971	3395	3.93	561
5		2.313	1432	1.66	295
6	Peak 5	2.521	30476	35.29	6854

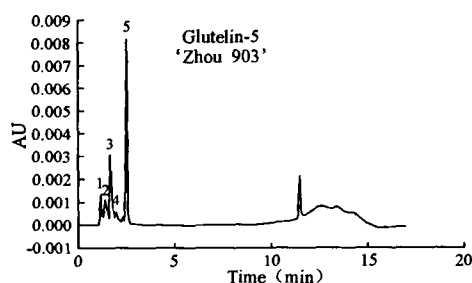


图 10 ‘舟 903’谷蛋白 HPLC 图谱
Fig. 10 HPLC map of glutelin of ‘Zhou 903’

表 6 ‘舟 903’谷蛋白 HPLC 结果分析
Table 6 Analyzing HPLC map of glutelin of ‘Zhou 903’

‘Zhou 903’	Peak name	PT (min)	Area	Area (%)	Height (μAU)
1	Peak 1	1.168	11762	13.68	1405
2	Peak 2	1.412	8378	9.74	1147
3	Peak 3	1.690	25768	29.97	3088
4	Peak 4	1.971	2826	3.29	488
5	Peak 5	2.313	1499	1.74	303
6	Peak 5	2.521	35743	41.57	7983

由以上 HPLC 的结果可以将‘537’、‘嘉育 948’、‘3089’、‘两优 932’和‘舟 903’五个样品的谷蛋白依据出现时间以及 AU 值,将其对应多肽分别分为峰 1、峰 2、峰 3、峰 4 和峰 5(见图 6~图 10)。

首先比较‘两优 932’和‘舟 903’两种优质水稻谷蛋白,由表 7 可知,它们的峰 1 和峰 3 的峰高相对差、峰面积相对差都小于 0.1,说明峰 1 和峰 3 的值比较稳定;峰 2、峰 4、峰 5 的峰高相对差和峰面积相对差都比较大,由大到小排列为:峰 2 > 峰 4 > 峰 5 > 峰 1 > 峰 3。作为对照的‘两优 932’和‘舟 903’两种优质水稻的谷蛋白亚基含量的差异主要表现在峰 2、峰 4、峰 5 上,而峰 1、峰 3 相对差异较小。

表 7 比较‘两优 932’和‘舟 903’谷蛋白 HPLC 结果
Table 7 Comparison of HPLC map of glutelin between ‘Liangyou 932’ and ‘Zhou 903’

Glutelin-4,5	Peak name	Δ Area (%)	Δ Height (%)
1	Peak 1	0.0809	0.0861
2	Peak 2	0.4137	0.2415
3	Peak 3	0.0283	0.0573
4	Peak 4	0.2013	0.1486
5	Peak 5	0.1474	0.1038

再分别以‘舟 903’作对照,比较‘537’、‘嘉育 948’和‘3089’三个样品。由表 8~表 10 可知,由于‘537’、‘3089’、‘两优 932’、‘舟 903’的峰 4 和峰 5 之间出现新的没有命名峰,这是由于分辨率的原因所致,5 个样品的 HPLC 图谱中的峰 3 和峰 4、未命名峰和峰 5 相连。重点考察峰 1、峰 2 和峰 3。对‘537’、‘嘉育 948’、‘3089’三个样品和‘舟 903’进行比较,可以看出峰 1 稳定上升但幅度不大;峰 2 的

变化幅度大,也呈上升趋势,其中‘3089’的变化幅度最明显;峰 3 的变化呈下降趋势,变化幅度很大,其中也以‘3089’的变化最明显。如果我们将这 3 个样品的品质与这些峰的变化趋势联系起来看,‘537’、‘嘉育 948’和‘3089’三个水稻样品的品质按很好、较好和好排列,则‘537’ > ‘嘉育 948’ > ‘3089’。很明显,其中峰 2 和峰 3 表现随品质变化而变化,而且变化明显。在 HPLC 的结果中出现的峰 1~峰 5 分别代表样品中谷蛋白的亚基,这些结果表明,水稻谷蛋白亚基含量的多少可以作为评价品种营养品质优劣的参考依据之一。但是,由于我们所分析的材料目前还不多,是否所有的材料都是这种情况,还需要做进一步的研究。

表 8 比较‘537’和‘舟 903’谷蛋白 HPLC 结果
Table 8 Comparison of HPLC map of glutelin between ‘537’ and ‘Zhou 903’

Glutelin-5,1	Peak name	Δ Area (%)	Δ Height (%)
1	Peak 1	0.0502	0.0064
2	Peak 2	0.0326	0.0209
3	Peak 3	0.9665	0.7834
4	Peak 4	1.7604	1.3627
5	Peak 5	0.2764	0.2943

表 9 比较‘嘉育 948’和‘舟 903’谷蛋白 HPLC 结果
Table 9 Comparison of HPLC map of glutelin between ‘Jiayu 948’ and ‘Zhou 903’

Glutelin-5,2	Peak name	Δ Area (%)	Δ Height (%)
1	Peak 1	0.0331	0.0249
2	Peak 2	0.0875	0.0619
3	Peak 3	0.3866	0.5952
4	Peak 4	0.5025	0.5984
5	Peak 5	0.5584	0.6019

表 10 比较‘3089’和‘舟 903’谷蛋白 HPLC 结果
Table 10 Comparison of HPLC map of glutelin between ‘3089’ and ‘Zhou 903’

Glutelin-5,3	Peak name	Δ Area (%)	Δ Height (%)
1	Peak 1	0.0487	0.0584
2	Peak 2	0.5112	0.2162
3	Peak 3	0.0423	0.0528
4	Peak 4	0.3421	0.3012
5	Peak 5	0.1428	0.1617

3 讨论

在实验中我们首先对谷蛋白的提取方法进行了改进。将以往常用的乳酸提取谷蛋白,用碱中和,沉淀谷蛋白的方法省去中和步骤,改用超滤管浓缩。这样简化了提取谷蛋白的方法。水稻与绝大多数的禾本科植物不同的是贮藏蛋白以谷蛋白为主:谷蛋白含量约为胚乳蛋白总量的 60%~80%,而另一主

要贮藏蛋白是醇溶蛋白,约占18%~20%^[3]。用70%的乙醇提取水稻种子中的醇溶蛋白;用乳酸来提取水稻种子中谷蛋白。SDS-PAGE是通过蛋白亚基的分子量大小对其进行分离的,可以分离大小差异为0.5 kD的蛋白质亚基分子。水稻种子贮藏蛋白中的谷蛋白在分离胶浓度为10%~14%进行不连续的SDS-PAGE电泳分析能分离出亚基:包括酸性亚基和碱性亚基,酸性亚基至少能分离出3条带谱,同时碱性亚基至少能分离出2条带谱。结果表明,谷蛋白的多态性较高,而醇溶蛋白的多态性很弱。虽然谷蛋白的电泳结果还不能单独用来鉴定水稻品种的营养品质,但这种电泳体系对研究谷蛋白的多态性以及谷蛋白的生化研究有一定帮助。

同时我们用高效液相色谱进行检验,进一步证实了谷蛋白量的变化。由HPLC的结果可以将‘537’、‘嘉育948’、‘3089’、‘两优932’和‘舟903’五个样品的谷蛋白依据出现时间以及AU值,将其对应多肽分别分为峰1、峰2、峰3、峰4、峰5和未知峰。通过对5个样品的HPLC结果数据的统计分析,可初步判定峰1、峰2和峰3的峰值和水稻品种品质的优差有一定的联系,从峰1、峰2和峰3的比较可以初步鉴定样品的品质。这提示水稻谷蛋白亚基含量的多少,可以作为评价品种营养品质优劣的参考依据之一。

水稻醇溶蛋白由一个约80~100个拷贝的基因家族所编码,其中多为假基因^[3]。所以对这类蛋白进行含量和质量上的改良工作很不容易。现已证实,水稻谷蛋白是由一个多基因家族编码的,分GluA和GluB两个亚族,GluA和GluB各自至少由4个成员组成^[3,8]。GluA-4和GluB-4转录区域内含有终止密码子,是两个假基因^[3,13]。由此推测谷蛋白变异要远远比醇溶蛋白容易得多。绝大多数的禾本科植物的主要贮藏蛋白是谷蛋白和醇溶蛋白。改善大米的营养价值可通过提高谷蛋白的含量来实现。例如为了满足肾脏病人和糖尿病人的需求,低蛋白食品市场的需求越来越大,也可通过改变谷蛋白的含量来加以实现。从以上的结果看出水稻谷蛋

白不仅有质的变异性还具有很高的多态性,通过改变谷蛋白的基因方法来改良谷蛋白的品质是有可能的。

参考文献:

- [1] Ogawa M, Kumamaru T, Satoh H, Iwata N, Omura T, Kasai Z, Tanaka K. Purification of protein body-I of rice seed and its polypeptide composition[J]. *Plant Cell Physiology*, 1987, 28: 1517 - 1527.
- [2] Resurreccion A P, Li X, Okita T W. Characterization of poorly digested protein of cooked rice protein bodies[J]. *Cereal Chem*, 1993, 70: 101 - 104.
- [3] 陈豫, 曲乐庆, 贾旭. 水稻种子储藏蛋白及其基因表达[J]. *遗传*, 2003, 25(3): 367 - 372.
- [4] Tanaka K. Isolation and characterization of two type of protein bodies in the rice endosperm[J]. *Agric Biol Chem*, 1980, 44: 1633 - 1639.
- [5] Tanaka Y. The relationship of the feces protein particles and rice protein bodies[J]. *J Agric Chem Soc Jpn*, 1975, 49: 425 - 429.
- [6] Sarker S C, Ogawa M, Takahashi M, Asada K. Processing of a 57 kDa precursor peptide to subunits of rice glutelin[J]. *Plant Cell Physiol*, 1986, 27: 1579 - 1586.
- [7] Kagawa H, Hirano H, Kikuchi F. Variation of glutelin seed storage protein in rice[J]. *Jpn J Breed*, 1988, 38: 327 - 332.
- [8] 江绍玫, 徐朗莱, 万建民. 水稻谷蛋白研究进展[J]. *江西农业大学学报*, 2002, 24: 14 - 19.
- [9] Masako I, Takeo K, Tsukasa M. Rice allergenic proteins, 14-16 kDa albumin and α -globulin, remain insoluble in rice grains recovered from rice miso (rice-containing fermented soybean paste)[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, 69: 1137 - 1144.
- [10] Kumamaru T, Satoh H, Iwata N, Ogawa M. Mutant 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] Qu L Q, Wei X L, Hikaru S, Masahiro O. Mixro-heterogeneity of storage glutelin in rice seed[J]. *Acta genetia sinica*, 2001, 43(8): 815 - 820.
- [12] 萨姆布鲁克J, 弗里奇E F, 曼尼阿蒂斯T著. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 金冬雁, 黎孟枫等译. 北京: 科学出版社, 1999. 880 - 887.
- [13] Okota T W, Hwant Y S, Hnilo J. Structure and expression of rice glutelin multigene family[J]. *J Biol Chem*, 1989, 264: 12573 - 12581.