

红苋 R104 种子谷蛋白亚基组成及二硫键连接蛋白研究*

宋宏新** 汪沛洪

(西北农业大学生化研究室, 陕西杨陵 712100)

摘 要 应用还原和非还原单向 SDS-PAGE 及二者结合的双向电泳技术, 研究了红苋 R104 种子谷蛋白的亚基组成。谷蛋白由多种亚基组成, 高分子量二硫键连接蛋白占其多数, 经还原裂解成 A (54 KD)、B (40 KD, 39 KD)、C (33 KD, 31 KD)、D (22 KD, 20 KD, 18 KD) 和 E (15 KD) 5 组主要单肽链单元, 提出了二硫键连接蛋白的组成模式, 并发现低分子量谷蛋白亚基存在肽内二硫键。

关键词 籽粒苋, 谷蛋白, 双向电泳, 二硫键连接蛋白

中图分类号 Q512.4

籽粒苋 (*Grain Amaranthus*) 种子蛋白质含量高, 氨基酸组成平衡, 特别富含赖氨酸和含硫氨基酸, 是一种非常理想的食品蛋白质营养强化添加物^[1,2]。红苋 R104 (*A. Cruentus* R104) 为推广栽培最多的优良品种, 其种子含蛋白质 18% 以上, 而谷蛋白质占种子总蛋白的 60%^[3]。本研究通过单向和双向电泳方法, 研究了种子贮藏蛋白质主要成份——谷蛋白的亚基分子量组成及二硫键的构成特点, 为籽粒苋种子蛋白质加工利用, 遗传育种, 植物基因工程基因筛选, 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

红苋 R104 (*Amarathus. Cruents* R104) 引自美国, 由中国农业科学院作物栽培育种所岳绍先提供, 繁殖收获成熟种子, 风干清选后备用。

1.2 样品制备

种子用 1 mm 细筛微量旋风式样品磨粉碎, 再用十倍体积的石油醚脱脂。脱脂粉采用剩余一步法提取制样: 称取 0.2 g 样品, 分别依次用 H₂O 10% NaCl 和 75% 乙醇充分除去清蛋白、球蛋白和醇溶蛋白, 得到含剩余谷蛋白的离心沉淀。沉淀中加 1 mL 样品裂解液 (非还原样品裂解液 (- ME): 0.625 mol/L Tris-HCL, 3% SDS; 还原样品裂解液 (+ ME): 前者加入 5% 巯基乙醇)^[4,5], 常温振荡提取 1 h, 离心后取上清液, 点样前再加热煮沸 5 min, 点样量 20 μ L。

1.3 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

参照文献 [5] 方法。不连续垂直平板凝胶系统, 浓缩胶 4%, 分离胶 12.5%, 常温

收稿日期: 1996-01-16

* 国家自然科学基金资助课题; ** 现在工作单位西北轻工业学院食品系, 陕西咸阳 712081。

30 m A恒电流电泳 依标准蛋白计算分子量。

1.4 双向电泳 SDS-PAGE(- ME)× SDS-PAGE(+ ME)

按 Singh报道的方法^[6]进行。第二向经还原裂解胶带,用浓缩胶缓冲液热溶的 1% 琼脂糖封固于加样槽。

2.结果及分析

2.1 红苋 R104种子谷蛋白的 SDS-PAGE分析

图 1结果显示,谷蛋白非还原(- ME)条件 SDS-PAGE图谱条带有 40多条,49 KD以下的低分子量谱带有十几条,主要在 13~ 17 KD和 31~ 36 KD区间,49 KD以上亚基,由于其分子量大故称其为高分子量谷蛋白亚基(HMW Glutenin Subunits),该区亚基种类多,含量高,呈密集排列,与还原条件形成明显差别 依含量由大到小排列主要亚基为 49 KD,55 KD,108 KD,130 KD,114 KD,75 KD,78 KD,94 KD,162 KD和 180 KD。

还原条件巯基乙醇使二硫键断裂,从而使含肽链间二硫键的蛋白质亚基(分子)裂解变小成其单肽链单位。SDS-PAGE(+ ME)图谱显示,49 KD以上的高分子量区谱带明显减少,谱带总数有 30多条,其中高含量的单肽链有 5组: A(54 KD),B(B₁= 40 KD,B₂= 39 KD),c(C₁= 33 KD,C₂= 31 KD),D(D₁= 22 KD,D₂= 20 KD,D₃= 18 KD),(E(15 KD),以 A C和 D 3组含量最高。

非还原和还原条件 SDS-PAGE图谱的明显差别,说明谷蛋白含有丰富的二硫键 二硫键在维持其分子结构中起着重要作用。

2.2 红苋 R104种子谷蛋白的 SDS-PAGE(- ME)× SDS-PAGE(+ ME)双向电泳分析

结果见图 2。上端为非还原谱带。左侧为还原条件谱带,作为对照及分子量标准。

图 2显示 (1)排列于对角线上为不含二硫键的亚基,78 KD亚基及为数众多的低分子量亚基为该亚基 (2)图中下边箭头所示的低分子量区,对角线上方有染色点。第一向 17~ 18 KD亚基,第二向其电泳淌度稍有变慢,这是由于还原打开了该类亚基链(单肽链)内二硫键,肽键更完全伸展所致,证明有肽链内部二硫键存在,小麦种子谷蛋白有类似情况^[6]。(3)大多数高分子量谷蛋白亚基及 36 KD和 35 KD亚基还原断裂肽链间二硫键,裂解较小分子量的单链键而位于对子线下方。

第一向的十几种分子量大小不同的高分子量亚基,裂解成种类较简单一致的五组小分子量单肽链 各亚基的单肽链组成的种类和数(含)量上有别: (1)100 KD以上亚基,单肽链 A含量高,普遍存;B组则含量很少,在 130 KD以上的亚基中不含有;C组多少不一,以 C₁为主;D组含量亦高,主要为 D₁和 D₂。(2)78 KD~ 49 KD范围亚基,以单肽链 C

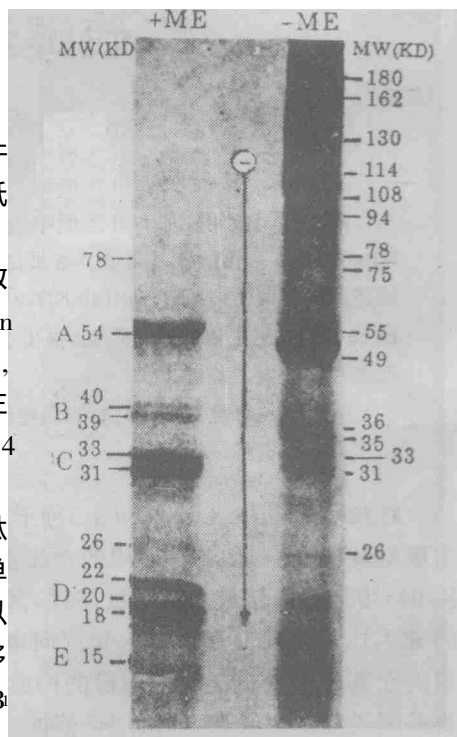


图 1 红苋 R104种子谷蛋白
SDS-PAGE图谱
(+ ME为还原条件,- ME为非还原条件)

组和 D组为主,含量最高 (3)36 KD~ 35 KD较小分子量亚基则以小分子量的 D组单肽链为主,有少量单肽链 E.

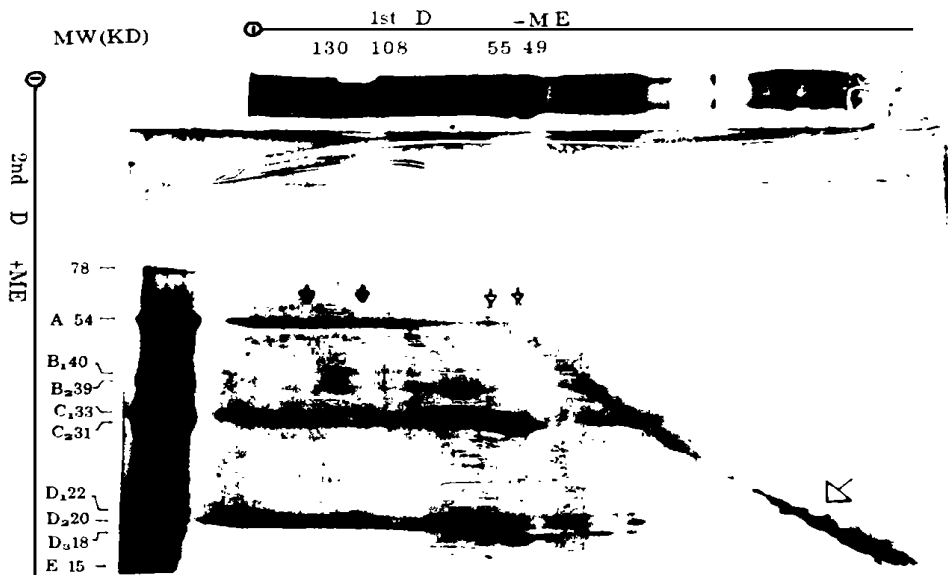


图 2 红苋 R104种子谷蛋白 SDS-PAGE(- ME)×
SDS-PAGE(+ ME)双向电泳图谱

对四个高含量的亚基单独进行第二向电泳结果见
图 3.

从构成亚基的单肽链种类和含量两方面分析,计算图 3中四个亚基的肽链组成和分子量如下: (1)130 KD亚基, 2A+ D₂($\times$ 54+ 20= 128 KD) (2)108 kD亚基, A+ C₁+ D₁(54+ 33+ 22= 109 KD), A+ C₁+ D₂(54+ 33+ 20)= 107 KD),说明该亚基为第一向未充分分离的分子量相近的两个含二硫键亚基。 (3)55 KD亚基, G+ D₁(33+ 22= 55 KD),高含量亚基 (4)49 KD亚基, C₂+ D₃(31+ 18= 49 KD),含量最高的亚基

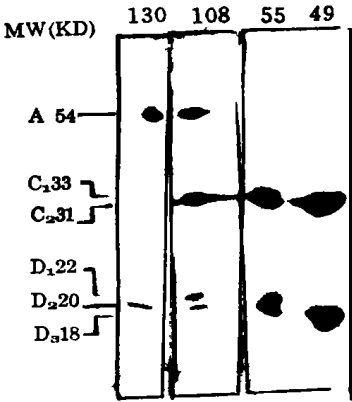


图 3 130 KD 108 KD 55 KD
和 49 KD的单独双向电泳图

3 讨 论

1)红苋 R104种子贮藏蛋白质的最主要部分是谷蛋白,研究发现谷蛋白含有丰富的二硫键 二硫键在维持亚基结构中起着非常重要的作用。大多数高分子谷蛋白亚基中含有二硫键,故称其为二硫键连接蛋白 (Disulphide-linked proteins)^[6],它是由几组不含二硫键的单肽链通过肽链间二硫键连接形成的。基于上述研究分析结果,在只考虑分子量因素的情况下,推断出谷蛋白二硫键连接蛋白 (亚基)的主要单肽链组成模式如表 1:

表 1 红苋 R014种子谷蛋白高分子量二硫键连接蛋白的单肽链组成

裂解后单肽链 (+ M E)	二硫键连接组成		高分子量亚基 (- M E)
	组成模式	分子量计算	
	2A+ C ₁ + 2D ₂	2× 54+ 33+ 2× 20= 180	180
A 54	2A+ C ₁ + D ₂	2× 54+ 33+ 20= 161	162
B ₁ 40	2A+ D ₁	2× 54+ 22= 130	130*
B ₂ 39	2A+ D ₂	2× 54+ 20= 128	
C ₁ 33	A+ B ₁ + B ₂	54+ 40+ 39= 123	123
C ₂ 31	A+ B ₁ + D ₂	54+ 40+ 20= 114	114
D ₁ 22	A+ C ₁ + D ₁	54+ 33+ 22= 109	
D ₂ 20	A+ C ₂ + D ₁	54+ 31+ 22= 107	108
	A+ C ₂ + D ₂	54+ 31+ 20= 105	
D ₃ 18	A+ 2D ₂	54+ 2× 20= 94	94
	不含二硫键	78	78
E15	C ₁ + D ₁ + D ₂	33+ 22+ 20= 75	75
	C ₁ + D ₂	33+ 22= 55	55
	C ₂ + D ₃	31+ 18= 49	49
	2D ₃	18+ 18= 36	36
	C ₂ + E	20+ 15= 35	35

表中数字为分子量,以千道尔顿 (KD)为单位,* 画横线者为单独电泳测定亚基

表 1中的亚基组成模式与双向电泳比较,单肽链的种类、数量分布都很吻合。从模式计算出的分子量与第一向电泳测定的主要谱带分子量(表右侧)对应比较可以看出:在 35~ 94 kD的较低分子量区,二者一致性很好,特别是高含量的 49 KD和 55 KD亚基,经单独电泳证明这种组成模式是完全可信的。而 100 KD以上的高分子量亚基区,二者有不同程度的差别,分析其原因:主要是高分子量区亚基种类多,分子量差别小,电泳分离不充分,SDS- PAGE测定用标准蛋白为 17~ 94 KD的低分子量标准,则分子量测定准确性差,其次为高分子量区亚基组成单肽链单元多,组合模式复杂多样等因素造成的结果。

表 1仅给出了每种高分子量二硫键连接蛋白的一种组合模式,而对于由多条单肽链单元形成的组合,实际上不可能并不是唯一的。就是说可能还会有其他的组合模式。实验中通过 IEF还发现了单肽链具有电荷多态性。肽链本身的特异结构、电荷特征和二硫键等共同作用,决定了谷蛋白高分子量二硫键连接蛋白的组成结构,所以要阐明其详细结构还有许多问题需要深入研究。

(2)谷蛋白在红苋 R104种子蛋白中所占的比例类似于水稻,但亚基组成特点与水稻差别较大^[4],和小麦种子谷蛋白表现出相似性,小麦高分子量谷蛋白亚基含有丰富的二硫键^[6],高分子量谷蛋白亚基在决定小麦面团的弹性、加工工艺特性,特别是面包烘焙品方面起着重要的作用^[6,7]。蛋白质的二硫键特性在豆类加工中起着重要作用。可以预见,籽粒苋谷蛋白富含二硫键高分子量亚基,在决定其加工利用方面也将起到重要作用,与加工品质相关的功能性质亦很值得研究探讨。

参 考 文 献

- 1 陈毓荃,汪沛洪. 美国籽粒苋的营养品质及蛋白质组分的初步研究. 作物品种资源, 1988(4): 20~ 22
- 2 岳绍先. 籽粒苋的营养成份及应用潜力. 作物学报, 1987, 13(2): 150~ 155
- 3 岳绍先,孙鸿良. 美国籽粒苋在国内引种试种三年表现及利用问题. 作物品种资源, 1986(2): 39~ 41
- 4 赵文明. 水稻谷蛋白是类似于豆球蛋白的蛋白质. 实验生物学报, 1988, 21(1): 239~ 243.
- 5 西北农业大学主编. 基础生物化学实验指导. 西安: 陕西科学技术出版社, 1986.
- 6 Singh N K, Shepherd K W. The structure and genetic control of a new class of disulphide-linked proteins in wheat endosperm. T. A. G. 1985, 71: 79~ 92
- 7 Peter I Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on Bread making Quality. Ann. Rev. plant physiol. 1987, 38: 141~ 153
- 8 Wang G, Snape J W. The high-molecular-weight glutenin subunit compositions of Chinese bred wheat varieties and their relations with bread-making quality. Euphytica, 1993, 68: 205~ 212

Disulphide-linked Proteins and Subunit Composition of the Glutelin of *Amaranth credentus* R104

Song Hongxin

(Northwestern Institute of Light Industry, Xi'an, Shaanxi, 712081)

Wang Peihong

(Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

Abstract Under non-reducing or reducing conditions, the one-dimensional or two-dimensional methods were employed in this research on the glutelin of *A. credentus* R104 seed. The results showed that the glutelin consisted of many subunits. The majority of the glutelin was HMW disulphide-linked proteins, which could be dissociated into five groups by reducing: A(54 KD), B(40 KD, 39 KD), C(33 KD, 31 KD), D(22 KD, 20 KD, 18 KD), and E(15 KD). So the HMW protein composition model was put forward accordingly.

Key words grain amaranth, seed protein, glutelin, electrophoresis, disulphide-linked proteins