

水稻清蛋白电泳鉴定方法及应用

兰静^{1,2}, 贾雯婧^{1,2}, 孙向东^{1,2}, 赵琳^{1,2}, 金海涛^{1,2}, 王冰^{1,2}, 张瑞英^{1,2*}

(1. 黑龙江省农业科学院农产品质量安全

研究所, 黑龙江哈尔滨 150086; 2. 农业农村部农产品质量安全风险评估实验室(哈尔滨), 黑龙江哈尔滨 150086)

摘要 对清蛋白提取方法进行优化, 建立水稻清蛋白电泳新方法。采用优化后清蛋白电泳方法进行谱带分析, 发现蛋白含量相近、食味评分不同的水稻品种, 70~105 kDa 处谱带缺失或谱带浓度加强。初步确认 105 kDa 是与稻米食味相关的谱带, 谱带颜色越深, 稻米食味品质越好。

关键词 水稻; 清蛋白; 电泳; 食味品质

中图分类号 S511 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)01-0176-02

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.01.053



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Method and Application of Rice Albumin Electrophoresis Identification

LAN Jing^{1,2}, JIA Wen-jing^{1,2}, SUN Xiang-dong^{1,2} et al (1. Quality and Safety Institute of Agricultural Products, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Agro-products (Harbin), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract The aim is to optimize the extraction method of albumin and establish a new method of rice albumin electrophoresis. It was found that for rice from different sources, a loss or enhancement of band intensity at 70~105 kDa with similar protein content whereas different sensory evaluation scores by using the improved spectral band analysis of albumin electrophoresis method. It was preliminarily confirmed that 105 kDa is the band associated with rice sensory quality. The denser the band, the better the taste quality of rice.

Key words Rice; Albumin; Electrophoresis; Taste quality

水稻品种的品质性状是育种工作的重要目标, 早期品质选择方法的实用性与合理性是育种者关心的重要问题。水稻食味品质是水稻品质育种的终极目标^[1-2], 在水稻早期世代材料筛选上一直是盲区, 没有较好的评价技术。蛋白质作为稻米品质的主要性状, 是稻米品质改良不可忽视的重要方面。关于蛋白质与稻米品质之间的关系, 国内外已有的报道主要集中在表观蛋白质含量与食味品质之间的关系变化上^[3]。通常稻米蛋白质含量越高其食味值越低^[4-5], 而对于蛋白质含量接近的稻米其食味值有的相差较大, 需从蛋白质组分、结构方面加以阐述。

水稻蛋白质中的贮藏蛋白质是水稻的第二大营养成分, 含量占 5.5%~12.0%。稻米中的蛋白质根据其在不同溶剂中的溶解性不同可分为清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白^[6]。贮藏蛋白在稻米中分布不均, 清蛋白主要分布在糊粉层和次糊粉层。研究表明, 清蛋白占水稻总贮藏蛋白的 2%~5%^[7-9], 是与食味品质相关的蛋白。目前有关清蛋白的研究报道甚少^[10], 而关于清蛋白电泳技术鲜见报道。将水稻食味品质蛋白质电泳评价技术用于水稻早期世代材料筛选, 对于缩短育种年限、加快水稻育种进程、提高水稻育种效率具有重要意义。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 水稻品种来源。粗蛋白质含量接近、食味评分不同的水稻品种龙粳香 1 号、长粒香 2 号、垦粳 12、龙粳 29、五优

稻、高粱稻来源见表 1, 其中长粒香 2 号分别来源于同江市和富锦市。不同来源水稻品种粗蛋白质含量 7.76%~7.91%, 食味评分 71.0~90.0。

表 1 不同来源水稻品种蛋白质含量及食味评分

Table 1 Protein content and taste score of rice varieties from different sources

品种名称 Variety name	来源 Source	粗蛋白含量 (干基) Crude protein content (dry base) // %	食味评分 Taste score
龙粳香 1 号 Longjixiang No. 1	同江市同江镇	7.91	71.0
长粒香 2 号 Changlixiang 2	同江市同江镇	7.76	71.0
长粒香 2 号 Changlixiang 2	富锦市锦山镇	7.90	73.0
垦粳 12 Kenjing 12	富锦市上街基乡	7.84	78.5
龙粳 29 Longjing 29	同江市青河镇	7.81	81.4
五优稻 Wuyoudao	泰来县平洋镇	7.78	85.0
高粱稻 Sorghum rice	肇源县大兴乡	7.70	90.0

1.1.2 化学试剂。所有试剂都是国产或进口分析纯, 用蒸馏水配制有关溶液, 电泳仪和电泳槽型号为 BIO-RAD Power Pac, 产地新加坡。

1.2 方法

1.2.1 大米粉制备和清蛋白提取。稻米经自然风干后, 每个稻米样品称取 100 g, 先用糙米机碾成糙米, 再将糙米通过精米机碾成精米。精米经磨粉机碾磨成粉, -20 °C 冰箱保存备用。

清蛋白提取参考杨静等^[5]、马建等^[10]方法并进行优化。提取清蛋白的溶剂为蒸馏水, 大米粉与蒸馏水的固液比为 1:1 (g:mL), 摇床振荡提取 2 h, 15 000 r/min, 离心 5 min, 取上清于 2 mL 离心管内, -20 °C 保存备用。

1.2.2 凝胶配制。

基金项目 国家重点研发计划七大作物育种项目子专题“北方粳稻品质分析与育种技术”(2017YFD0100501)。

作者简介 兰静(1968—), 女, 黑龙江哈尔滨人, 研究员, 硕士, 从事农产品质量安全品质评价与风险评估工作。*通信作者, 研究员, 硕士, 从事农产品质量安全品质评价与风险评估工作。

收稿日期 2019-07-08

1.2.2.1 分离胶的配制。

(1)取 27.23 g Trizma base 溶解于 80 mL 蒸馏水中,盐酸调 pH 至 8.8,蒸馏水定容至 150 mL。

(2)量取步骤(1)中的溶液 25 mL,加入 40 mL 30% Monomer Sol'n, 1 mL 10% SDS, 33.5 mL 蒸馏水,混匀 4 ℃ 保存备用。

(3)量取步骤(2)中的溶液 9.95 mL,加入 50 μL 10% 过硫酸铵,5 μL TEMED,混匀,灌入胶板中,上层加入蒸馏水封口,等待分离胶凝固。

1.2.2.2 浓缩胶的配制。

(1)将 6.0 g Trizma base 溶解于 60 mL 蒸馏水中,盐酸调 pH 至 6.8,蒸馏水定容至 100 mL。

(2)量取步骤(1)中的溶液 25 mL,加入 13 mL 30% Monomer Sol'n, 0.5 mL 10% SDS, 61 mL 蒸馏水,混匀 4 ℃ 保存备用。

(3)量取步骤(2)中的溶液 10 mL,加入 50 μL 10% 过硫酸铵,10 μL TEMED,混匀,待分离胶凝固,倒出表面的水层,将配制好的浓缩胶灌入胶板中,然后插入梳子,等待凝固。

1.2.3 电泳。蛋白提取液的配制:

0.125 mol/L Tris-HCl, pH=6.8, 4% SDS, 20% 甘油, 4 mol/L 尿素, 5% 巯基乙醇。清蛋白进样量 10 μL。电泳开始时,恒定电压为 100 V,当样品到达分离胶时,降低电压恒定至 80 V,电泳 2.5 h。

1.2.4 蛋白固定。

电泳结束,取出凝胶,将凝胶浸入 40 mL 10% 三氯乙酸中,摇床振荡固定蛋白,过夜固定。

1.2.5 染色与脱色。

凝胶置于 40 mL 考马斯亮蓝 R-250 溶液中,摇床染色 2 h,然后在冰乙酸:甲醇:水(10:45:45)溶液中脱色。

2 结果与分析

2.1 水稻清蛋白电泳方法优化

2.1.1 方法一。

称取 0.1 g 精米粉于 2 mL 离心管内,加入 1 mL 蒸馏水,于摇床上振荡提取 2 h,室温下 10 000 r/min 离心 10 min。将上清液转移到 10 mL 刻度试管中,重复提取 3 次合并提取液,即为清蛋白溶液,-20 ℃ 保存备用^[5]。

2.1.2 方法二(改进方法)。

称取 1 g 精米粉于 2 mL 离心管内,加入 1 mL 蒸馏水,搅拌至均匀,浸提 1 h,室温下 15 000 r/min 离心 5 min。取上清液(清蛋白溶液)于 2 mL 离心管内,-20 ℃ 保存备用。

2.1.3 2 种方法比较。

改进的水稻清蛋白提取方法,稻米经自然风干后研磨成大米粉,向大米粉中按固液比 1:1 加入水,搅拌至均匀,浸提 1 h 后离心,取上清,即为水稻清蛋白提取液。浸提后室温下 15 000 r/min 离心 5 min,较方法一离心力大,清蛋白提取效果更彻底。

由图 1 可知,方法一得到的清蛋白电泳图谱几乎看不见谱带(A);而方法二得到的清蛋白图谱中谱带清晰可见(B),且方法二在 2 个水稻品种中的提取效果基本相同,说明该方法具有广泛适用性,稳定性好。

2.2 蛋白质含量相近的大米样品清蛋白电泳差异分析

对蛋白质含量接近、食味评分相差较大的 7 个样品进行清蛋白

电泳图谱分析。从图 2 可以看出,龙粳香 1 号水稻样品谱带与其他样品谱带不同,在 70~105 kDa 处出现了谱带的缺失;在 105 kDa 处,长粒香 2 号样品也出现了谱带的缺失。由表 1 可知,这 2 个样品的食味评分很低。谱带颜色较深的高粱稻,其食味评分最高。龙粳 29 和五优稻的谱带颜色次之,其食味评分也对应下降。

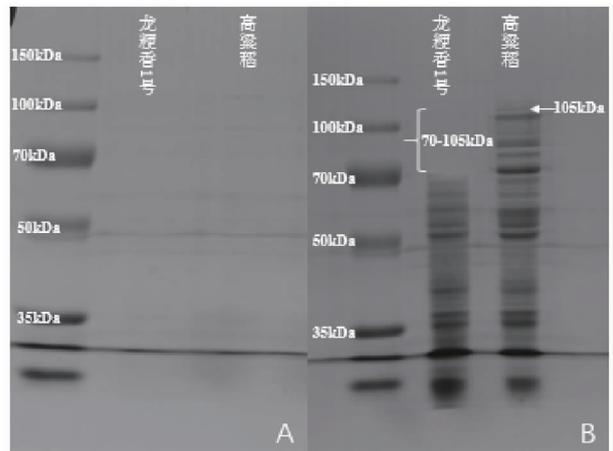


图 1 不同清蛋白提取方法电泳图谱比较

Fig. 1 Comparison of electrophoresis profiles of different albumin extraction methods

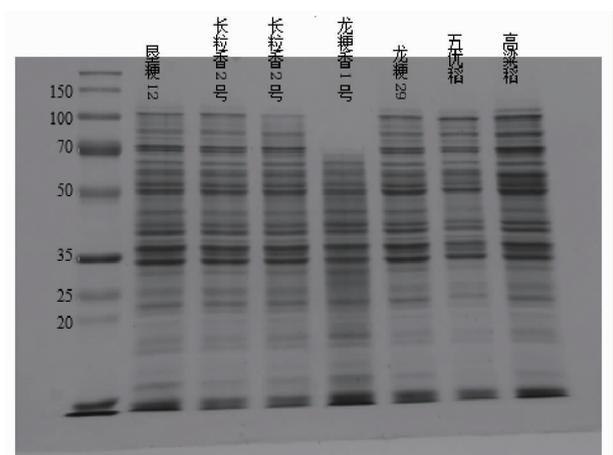


图 2 蛋白质含量相近的水稻清蛋白电泳图谱比较

Fig. 2 Comparison of albumin electrophoresis with similar protein content

3 讨论

目前对水稻清蛋白电泳方法研究较少,利用该方法对水稻食味品质进行评价鲜见报道。采用该研究提供的水稻清蛋白提取方法,提取的清蛋白更加充分,清蛋白提取率提高,且得到的电泳图谱更加清晰,适合于不同来源的水稻品种的鉴定,对指导水稻品质育种具有重要意义。

现有研究表明,水稻表观蛋白质含量越低,米饭食味值越高。对于表观蛋白质含量相近、食味值差异较大的水稻品种,通过清蛋白电泳图谱分析,初步发现 105 kDa 处谱带缺失,米饭食味值较低;105 kDa 处谱带颜色越深,其米饭食味值越高。105 kDa 为水稻食味优质亚基。该研究首次将水稻

(下转第 180 页)

表3 HFA小鼠肠道中细菌数量($n=12$)Table 3 The bacterial counts in HFA mouse intestine ($n=12$)

组别 Group	双歧杆菌 <i>Bifidobacterium</i>	乳酸杆菌 <i>Lactobacillus</i>	肠杆菌 Enterobacteriaceae	肠球菌 Enterococcus
CT	9.925 0±0.511 0	9.255 0±0.041 0	8.627 3±0.061 0	7.498 3±0.042 4
CT+LPH	10.101 0±0.703 0*	9.537 0±0.052 6*	8.470 4±0.067 5*	7.243 7±0.052 9*
CT+LPM	10.435 0±0.067 2**	9.765 0±0.013 0**	8.124 9±0.005 0**	7.003 1±0.008 3**
CT+LPL	10.237 0±0.081 1*	9.626 3±0.047 3*	8.453 1±0.070 6*	7.216 5±0.081 4*

注:与CT组相比较,* $P<0.01$,** $P<0.05$ Note:Compared with CT group,** $P<0.01$,* $P<0.05$ 表4 HFA小鼠肠黏膜sIgA含量($n=12$)Table 4 Contents of sIgA in HFA mouse intestinal mucosa ($n=12$)

组别 Group	OD ₄₅₀	sIgA/μg/mL
CT	0.096 0±0.002 9	5.378 7±0.114 5
CT+LPH	0.097 7±0.003 2	5.747 0±0.114 7*
CT+LPM	0.118 3±0.003 1	6.230 7±0.114 5**
CT+LPL	0.108 0±0.002 5	5.794 0±0.094 6*

注:与CT组相比较,* $P<0.01$,** $P<0.05$ Note:Compared with CT group,** $P<0.01$,* $P<0.05$

3 讨论

近年来,肠道菌群对人类健康的影响受到越来越广泛的关注,一方面肠道菌群不仅促进人体健康,调节人体代谢;另一方面人类的某些疾病是因肠道微生物失衡造成的,比如肥胖、乳糜泻、炎症性肠道疾病等^[12]。肥胖在我国已成为青少年健康的最大危害因素之一,已有研究发现肥胖和个体肠道微生物菌群之间有着密切的关系^[13]。随着越来越多学者对肠道菌群的研究发现通过移植外援肠道微生物群可以恢复患者肠道微生物群落平衡,此项技术可以作为对某些疾病治疗的有效手段^[14]。利用动物模型研究食物及药物对人类疾病的影响是临床上常用的研究方法,但动物与人的肠道菌群种类不同,生理代谢也有明显差异。该试验构建的菌群人源化动物模型,比普通动物模型在研究肠道微生态方面更具有优势。

肠道菌群在机体肠道中存在动态平衡,维持机体正常代谢,而双歧杆菌和乳杆菌为肠道中的优势菌,可抑制病原菌在肠道的定殖,维持肠道微生态平衡。在该试验中,与空白组相比较,3个剂量组HFA小鼠肠道内双歧杆菌、乳酸杆菌菌群数量都有明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),肠杆菌和肠球菌数量减少($P<0.05$),说明黑枸杞多糖能够调节肠道菌群,刺激肠道内原有有益菌双歧杆菌和乳酸杆菌的增殖,抑制肠杆菌和肠球菌的繁殖,起到益生元的作用。

sIgA是肠黏膜上的主要免疫球蛋白,作为肠道黏膜上的第一道防线,其可以阻止各种内源性共生菌及外源性致病菌的侵入。该试验中,与空白组相比较,3个剂量组HFA小鼠肠道黏膜sIgA含量都增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明黑枸杞多糖能促进HFA小鼠肠黏膜sIgA的分泌,增强HFA小鼠肠道免疫功能。而肠黏膜液sIgA也对肠道菌有调节作用,可以促进肠道菌群平衡,阻止食物中外来致病菌的侵入,进一步保护平衡肠道微生物菌群,提高机体免疫力。

参考文献

- [1] 汪建红,陈晓琴,张蔚佼.黑果枸杞果实多糖抗疲劳生物功效及其机制研究[J].食品科技,2009,34(2):203-207.
- [2] 张玲艳,王宏权.黑枸杞花青素的提取及其抗氧化活性研究[J].食品工业,2014,35(12):88-91.
- [3] 李树鹏,赵献军.黄芪多糖及益生菌合生元对雏鸡肠道微生态区系的影响[J].家畜生态学报,2005,26(3):21-25.
- [4] 石丹,张宇.蒲公英多糖对小鼠肠道微生态的调节作用[J].微生物学免疫学进展,2016,44(3):49-53.
- [5] 韩伟东,李丽秋,马淑霞,等.香菇多糖对溃疡性结肠炎大鼠肠道微生态失调的调整作用研究[J].中国微生态学杂志,2011,23(5):423-425.
- [6] 张静,胡新中,李俊俊,等.燕麦β-葡聚糖与沙蒿胶多糖对菌群人源化小鼠生理及肠道微生物调节比较研究[J].食品科学,2015,36(9):146-153.
- [7] 曾本华,唐欣,李文霞,等.肥胖患者HFA小鼠模型的建立[J].中国微生态学杂志,2012,24(4):289-291.
- [8] 娄涛涛,金玲,陀扬凌,等.黑果枸杞多糖提取工艺及其含量测定中显色条件优化研究[J].亚太传统医药,2017,13(5):16-20.
- [9] 张晓婧,曾本华,刘智伟,等.两种不同品系小鼠的人源菌群模型的建立与肠道菌群的比较[J].中国微生态学杂志,2013,25(4):376-380.
- [10] 张艳,刘均斌,张晶,等.平板活菌计数法检测粪便中的肠道菌群[J].首都医科大学学报,2008,29(1):85-86.
- [11] 张圣方,赵龙玉,赵凤春,等.泰山蛹虫草多糖对免疫抑制小鼠肠道菌群及分泌型免疫球蛋白A的影响[J].食品科学,2015,36(5):148-152.
- [12] TILG H, MOSCHEN A R, KASER A. Obesity and the microbiota[J]. Gastroenterology, 2009, 136(5): 1476-1483.
- [13] 张晨虹,赵立平.肠道菌群在肥胖及相关的代谢性疾病发生发展中的地位和作用[J].前沿科学,2007(3):75-80.
- [14] BAKKEN J S. Fecal bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile* infection[J]. Anaerobe, 2009, 15(6): 285-289.
- [15] 杨静,罗秋香,钱春荣,等.氮素对稻米蛋白质组分含量及蒸煮食味品质的影响[J].东北农业大学学报,2006,37(2):145-150.
- [16] 杨宝峰.水稻种子贮藏蛋白的多态性研究[D].金华:浙江师范大学,2008.
- [17] 张启莉.稻米蛋白质影响米饭蒸煮食味品质的研究[D].雅安:四川农业大学,2012.
- [18] MANDAL S, MANDAL R K. Seed storage proteins and approaches for improvement of their nutritional quality by genetic engineering[J]. Current science, 2000, 79: 576-589.
- [19] 吴殿星,舒小丽.稻米蛋白质的研究与利用[M].北京:中国农业出版社,2008:1-10.
- [20] 马建.几种电泳技术在水稻品种鉴定上的比较研究[D].延吉:延边大学,2005.

(上接第177页)

清蛋白电泳技术应用于稻米食味品质评价中,从蛋白质组分结构方面对稻米食味品质进行评价更加科学。

参考文献

- [1] 刘建,曹高燧,杜锦,等.中日泰优质稻米的外观及食味差异性研究[J].中国农业科技导报,2017,19(10):59-65.
- [2] 石吕.水稻精米蛋白质含量与稻米品质变化的关系[D].扬州:扬州大学,2017.
- [3] 沈鹏,罗秋香,金正勋.稻米蛋白质与蒸煮食味品质关系研究[J].东北农业大学学报,2003,34(4):378-381.
- [4] 王继馨,张云江,程爱华,等.水稻蛋白亚基含量对米饭食味的影响[J].中国农学通报,2008,24(1):89-92.