

2个枸杞品种的蛋白质提取与鉴定

张海燕, 徐 炜, 张立刚

(兰州新区现代农业发展研究院有限公司, 甘肃 兰州 730300)

摘要: 以枸杞品种蒙杞 1 号和宁杞 1 号为材料, 通过制浆、盐析、透析、浓缩、电泳、分析等方法对其中的蛋白质进行提取分离、鉴定, 探讨其在不同 pH 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度梯度下蛋白质的差异。结果表明, 蒙杞 1 号在相同 pH 下, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 40% 时蛋白质含量最多, 共有 7 种亚基, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 80% 时基本没有蛋白质; 在相同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度下, pH 6 时亚基数为 7, 即蒙杞 1 号在 pH 6.0、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度 40% 时提取效果最佳。宁杞 1 号在相同 pH 下, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 60% 时蛋白质含量最多, 共有 5 个亚基; 在相同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度下, pH 7.0 时亚基数为 5, 即宁杞 1 号在 pH 7.0、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 60% 时提取效果最好。

关键词: 枸杞; 蛋白质; 提取; 电泳; 鉴定

中图分类号: S 567 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2020)12-0012-04

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2020.12.004](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2020.12.004)

Extraction and Identification Protein of Two *Lycium barbarum* Cultivars

ZHANG Haiyan, XU Wei, ZHANG Ligang

(Lanzhou New Area Modern Agricultural Development Research Institute Co., Ltd., Lanzhou Gansu 730300, China)

Abstract: Mengqi 1 and Ningqi 1 *Lycium barbarum* L. were used as materials to extract and identify proteins by pulping, salting out, dialysis, concentration, electrophoresis, analysis and other methods, so as to explore the differences of proteins under different pH and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration gradient. The results showed that Mengqi 1 had the most protein content when $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration was 40% at the same pH value, with a total of 7 subunits. When $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration was 80%, there was basically no protein; under the same concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, the subunits is 7 at pH 6.0, that is, Mengqi 1 has the best extraction effect at pH 6.0 and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration at 40%. Ningqi 1 had the most protein content when $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration was 60% at the same pH value, with 5 subunits in total; under the same $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration, the subunits is 5 at pH 7.0, that is, Ningqi 1 has the best extraction effect when pH 7.0 and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration is 60%.

Key words: *Lycium barbarum* L.; Proteins; Extraction; Electrophoresis; Identification

枸杞(*Lycium barbarum*)为茄科枸杞属, 别名枸杞菜、红珠仔刺、牛右力、狗牙子、狗牙根、狗奶子, 多分枝灌木, 果实呈椭圆形或圆柱形, 枸杞一般喜光照^[1]。近年来, 枸杞作为药食兼用的名贵资源已为国内外学者所瞩目, 特别是国内许多学者对枸杞的化

学成分、结构以及功能评价等方面进行了许多卓有成效的研究, 并用现代医学理论和化学方法研究了枸杞的化学成分及功能因子, 尤其对枸杞多糖的提取分离、化学分析、药理作用及临床应用已具有较广泛的研究基础^[2-3]。研究较多的另一大类活性物质为类

收稿日期: 2020-05-12

基金项目: 张海燕(1991—), 女, 甘肃张掖人, 助理工程师, 主要从事设施作物栽培与植物检验工作。联系电话: (0)18919844467。Email: 164979486@qq.com。

作者简介: 徐 炜(1983—), 男, 山西岢岚人, 高级畜牧师, 博士, 研究方向为设施农业。Email: 179063903@qq.com。

胡萝卜素, 还有核黄素、维生素 C、维生素 B₁、尼克酸、牛磺酸、17 种氨基酸以及铜、铁、锌、锰、镁、硒、钙等多种微量元素, 这些研究表明枸杞不仅营养丰富而且确实具有多方面的保健功能^[4-5]。蛋白质是构成人体各组分的重要物质, 枸杞中微量蛋白质也在枸杞功能中发挥着重要的作用, 但与之相关的报道相对较少。宁杞 1 号为宁夏农林科学院从中宁农家品种大麻叶中采用单株选优方法选育而成^[6], 是我国枸杞的主栽品种。蒙杞 1 号由内蒙古农牧科学院园艺研究所同内蒙古河套大学合作选育而成, 有寸杞之称, 和宁杞 1 号(地产)相比果实体积增大 1 倍以上, 特优级果率增加 73%, 果肉厚度增大 28%, 果实千粒重增加 994.9 g^[7]。

我们采用盐析、透析等方法, 对蒙杞 1 号和宁杞 1 号中蛋白质进行提取, 并利用蛋白质的 SDS 凝胶电泳技术测定 2 个枸杞中蛋白质的含量以及分析其电泳行为^[8], 对枸杞中的蛋白质进行分析, 以探索蛋白质含量与枸杞品质的关系, 为枸杞品质鉴定提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试枸杞品种蒙杞 1 号由内蒙古农牧科学院园艺研究所提供, 宁杞 1 号由宁夏农林科学院提供。

1.2 仪 器 设 备

数显恒温水浴锅, 营养果蔬破壁养生机, 海尔电冰箱, 电子天平, TGL-16M 高速低温冷冻离心机(湘仪), 超纯水系统, 凝胶成像系统, SHZ-88 水浴恒温振荡器, 多功能电磁炉, 电泳仪, 电泳槽, 格兰仕微波炉。

1.3 方 法

1.3.1 蛋白质的提取 将种子洗净晾干, 称取蒙杞 1 号、宁杞 1 号各 60 g, 用破壁打浆机制浆, 用纱布粗过滤, 得到滤液。

1.3.2 盐析 盐析是指溶液中加入无机盐类而使某种物质溶解度降低而析出的过程, 蛋白质在自然环境中通常是可溶的, 其表面大

部分是亲水基团, 内部大部分是疏水基团。量取制浆后的枸杞液 20 mL, 分别根据体积计算出对应 pH 下的(NH₄)₂SO₄量, 如 pH 6.0 时, 向其中加入(NH₄)₂SO₄固体, 使蛋白质溶液的(NH₄)₂SO₄饱和度达 40%, 摇匀, 再静置 2~3 h 后 6 000 r/min 离心 20 min, 倾出上清液并向其中继续加入(NH₄)₂SO₄固体, 使蛋白质溶液的饱和度达 60%, 摇匀, 再静置 2~3 h 后以 8 000 r/min 离心 20 min, 倾出上清液并向其中继续加入(NH₄)₂SO₄固体, 使蛋白质溶液的饱和度达 80%, 摇匀, 再静置 2~3 h 后以 8 000 r/min 离心 20 min 弃去上清液。向 3 次离心后倾出上清液的离心管中加入 0.02 mol/L pH 6.0 的 PBS 缓冲液 5 mL, 轻轻摇动, 使贴于管壁上的蛋白质溶解后置冰箱中保存。用同样的方法对 pH 分别为 7.0 和 8.0 的枸杞蛋白提取液进行分级盐析, 最后制得 Ma1(6.0, 40%)、Ma2(6.0, 60%)、Ma3(6.0, 80%)、Mb1(7.0, 40%)、Mb2(7.0, 60%)、Mb3(7.0, 80%)、Mc1(8.0, 40%)、Mc2(8.0, 60%)、Mc3(8.0, 80%) 9 个蒙杞 1 号蛋白样液。用同样的方法得到 Na1(6.0, 40%)、Na2(6.0, 60%)、Na3(6.0, 80%)、Nb1(7.0, 40%)、Nb2(7.0, 60%)、Nb3(7.0, 80%)、Nc1(8.0, 40%)、Nc2(8.0, 60%)、Nc3(8.0, 80%) 9 个宁杞 1 号蛋白质样液。

1.3.3 透析 将 2 种蛋白质提取液分别装入透析袋中, 置于对应 pH 的 0.02 mol/L PBS 缓冲液中进行透析, 每隔 6~8 h 换 PBS 缓冲液 1 次, 连续透析 64 h。

1.3.4 浓缩 将装有蛋白质样液的透析袋置于盛有聚乙二醇的培养皿中浓缩, 直到蛋白质样液体积为 1 mL 左右为止。

1.3.5 蛋白质的鉴定 将枸杞蛋白质与样品缓冲液按体积比 1:1 混合, 加热煮沸 3 min, 10 000 r/min 离心, 分离胶和浓缩胶的制备方法见表 1^[10], 然后进行十二烷基磺酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)^[9]、染色和脱色 IV^[11], 最后照相。

表 1 分离胶和浓缩胶的制备方法

品种	30%Arc /mL	1%Bis /mL	分离胶缓冲液 /mL	浓缩胶缓冲液 /mL	双蒸水 /mL	10%SDS /uL	10%过硫酸铵 /mL	TEMED /uL
分离胶	9.75	7.5	3.75		8.8	100	0.3	80
浓缩胶	3.00	3.0		7.5	16.5	300	0.2	50

2 结果与分析

2.1 蒙杞 1 号电泳后条带分布情况

由蒙杞 1 号蛋白质电泳图谱(图 1)中条带的宽度和颜色深度不一可知, 每种蛋白的含量不同。在相同 pH 条件下, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 40% 时条带颜色最深, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 60%、80% 时依次降低, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 80% 时几乎没有条带。在相同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度下, pH 为 8 时蛋白质条带颜色最深。且每个泳道蛋白质条带数不同, 说明在不同条件下枸杞中蛋白质含量不同。

Ma1 Ma2 Ma3 Mb1 Mb2 Mb3 Mc1 Mc2 Mc3

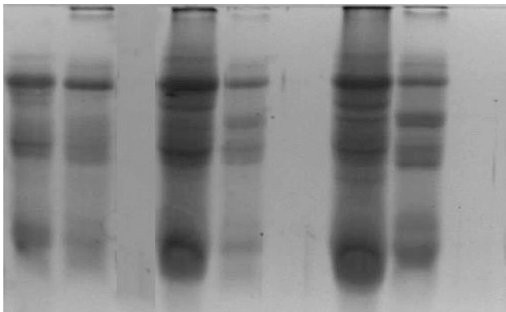


图 1 蒙杞 1 号蛋白质的电泳图谱

2.2 宁杞 1 号电泳后条带分布情况

由图 2 条带的宽度和颜色的深浅不一可知, 每种蛋白的含量不同。在相同 pH 下, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 60% 时蛋白质条带颜色最深, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 80% 时几乎没有蛋白质条带。在相同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度下, pH 为 6 时

Na1 Na2 Na3 Nb1 Nb2 Nb3 Nc1 Nc2 Nc3

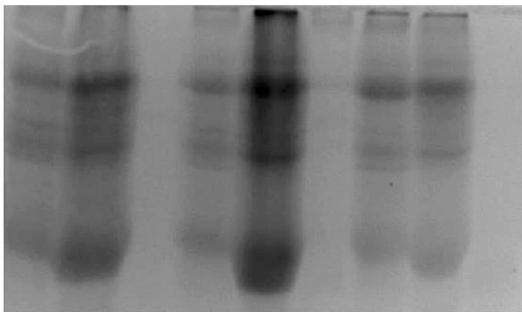


图 2 宁杞 1 号蛋白质的电泳图谱

蛋白质条带最多; pH 为 7、8 时蛋白质含量依次降低; pH 为 8 时几乎没有蛋白质条带。

2.3 2 个品种电泳后分析

蒙杞 1 号在 Na1(6.0, 40%) 的条件下, 有蛋白质亚基 7 种; 而宁杞 1 号在 Na1(6.0, 40%) 即相同条件下, 蛋白质亚基数为 5。其余在相同条件下, 除 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度为 80% 外, 蒙杞 1 号中蛋白质亚基数多于宁杞 1 号中蛋白质的亚基数。蒙杞 1 号在 Ma1(6.0, 40%) 和 Mc2(8.0, 60%) 条件下蛋白质亚基数均为 7, pH 为 8 时蛋白质亚基数为 0; 宁杞 1 号在 Na1(6.0, 40%) 和 Nb1(7.0, 40%) 条件下, 蛋白质亚基数均为 5, pH 为 8 时蛋白质亚基数也为 0。

3 结论

研究结果表明, 枸杞中存在一定量的蛋白质。蒙杞 1 号中的蛋白质亚基多于宁杞 1 号。相同硫酸铵浓度, 不同 pH 下, 蛋白质亚基数不同。蒙杞 1 号在 pH 6.0 时蛋白质亚基数最多, 即含量最多; pH 7.0、8.0 时蛋白质亚基数依次减少, 其中 pH 8.0 时几乎没有蛋白质, 亚基数为 0。宁杞 1 号在 pH 7.0 时蛋白质亚基数最多, 蛋白质含量最多; pH 6.0 时亚基数减少, 蛋白质含量降低; pH 8.0 时几乎没有蛋白质。在相同 pH、不同硫酸铵浓度下, 亚基数不同, 即蛋白质含量不同。蒙杞 1 号在硫酸铵盐浓度为 40% 时亚基数最多, 蛋白质含量最多; 硫酸铵盐浓度为 80% 时蛋白质含量最少, 亚基数为 0。宁杞 1 号在硫酸铵盐浓度为 80% 时蛋白质含量最少, 几乎没有蛋白质; 浓度在 60% 时相对较多, 40% 时亚基数最多, 蛋白质含量最高。综上所述可知, 蒙杞 1 号在 pH 6.0、硫酸铵盐浓度为 40% 时提取效果最好, 宁杞 1 号在 pH 7.0、硫酸铵盐浓度为 60% 时提取效果最佳。

PBO对早酥梨幼树树体生长及成花的影响

赵明新¹, 王向红², 毕淑海², 曹刚¹, 王玮¹, 曹素芳¹, 李红旭¹

(1. 甘肃省农业科学院林果花卉研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃亚盛实业(集团)有限公司条山农工商开发分公司, 甘肃 兰州 730040)

摘要: 以2年生早酥梨为试材, 在生长季不同时期喷施不同浓度的PBO, 以喷清水为对照, 通过测量干周、主枝长度和粗度并统计树体成花量, 分析不同喷施时间和浓度PBO处理对早酥梨幼树树体生长及成花的影响。结果表明: 经PBO喷施处理后, 早酥梨幼树枝条长度的年生长量均受到显著抑制, 而主枝粗度增加, 干周年生长量显著增加; 喷施PBO能在一定程度上提高早酥梨幼树枝条的成花率。5月10日和5月25日处理的200倍液和300倍液效果明显, 可以在控制枝条生长的同时又能促进成花。

关键词: PBO、早酥梨、树体生长、花芽数量

中图分类号: S661.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2020)12-0015-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2020.12.005

梨树的省力密植栽培模式具有结果早、单产高、省工、省力等特点, 近几年在甘肃河西地区得到大面积的推广。早酥梨作为甘肃省生产上栽培的主要品种, 已成为农民脱

收稿日期: 2020-10-09

基金项目: 院列青年基金“PBO调控早酥梨幼树生长与成花机理研究(2017GAAS79)”, 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(CARS-28-47)。

作者简介: 赵明新(1985—), 男, 山东济南人, 副研究员, 研究方向为果树栽培生理。联系电话: (0931)7611733。

通信作者: 李红旭(1974—), 男, 陕西岐山人, 研究员, 研究方向为果树育种与栽培生理。联系电话: (0931)7611733。

参考文献:

- [1] 张能荣, 施巧琳, 金清. 枸杞子综合开发策略[J]. 中国中医药信息杂志, 2005(9): 50-51.
- [2] 张民, 马茜, 王剑, 等. 枸杞多糖的纯化及相对分子质量研究[J]. 中国食品添加剂, 2011, 10(27): 5-11.
- [3] N HE, YANG X, JIAO Y, et al. Characterisation of antioxidant and antiproliferative acidic polysaccharide from chinese wolfberry fruits [J]. Food Chemistry, 2012, 133(1): 978-979.
- [4] 陆健. 蛋白质纯化技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 196.
- [5] JING E. Construction and analysis on the source model of competitive advantage of Ningxia wolfberry industrial cluster[J]. IEEE, 2011, 6(11): 201-378.
- [6] 李一婧. 宁夏枸杞中蛋白质的提取与鉴定[J]. 种子, 2011, 30(9): 3-5.
- [7] 王建民, 王建平, 郭喜平, 等. 蒙杞1号枸杞新品种的选育[J]. 作物研究, 2007(3): 415-417.
- [8] 张晓薇. SDS-PAGE对不同产地及质量枸杞的鉴别研究[J]. 光明中医, 2011, 26(5): 917-919.
- [9] 郑蕊, 岳思君. 枸杞花药蛋白质组双向电泳体系的建立及应用[J]. 西北植物学报, 2011, 31(12): 55-89.
- [10] 黄国霞, 危雅乐. SDS-PAGE电泳法分析鳖中蛋白质[J]. 食品科技, 2011, 36(11): 255-260.
- [11] 杨彦忠, 寇思荣, 何海军, 等. 玉米蛋白质品质改良研究进展[J]. 甘肃农业科技, 2001(3): 3-6.
- [12] 林丽, 张延红, 陈红刚, 等. 秦艽种子蛋白质电泳提取方法研究[J]. 甘肃农业科技, 2008(7): 23-25.

(本文责编: 杨杰)