

# 花生种子贮藏蛋白的氨基酸组成分析及发育过程中 17.5 kDa多肽的合成规律

芦春斌<sup>1</sup>, 黄上志<sup>2</sup>, 汤学军<sup>2</sup>, 傅家瑞<sup>2</sup>

(1. 暨南大学生殖免疫中心, 广东 广州 510632; 2. 中山大学生物科学与技术系, 广东 广州 510275)

**摘要:** 分析了两种不同蛋白质组成类型花生的子叶总蛋白 3 个主要组分及高甲硫氨酸类型花生的 60.5、41、38.5、18 和 17.5 kDa 多肽的氨基酸组成, 结果表明它们均含有 17 种氨基酸, 其中天冬氨酸、谷氨酸和精氨酸含量最高, 而甲硫氨酸含量和半胱氨酸水平都极低。高甲硫氨酸类型品种的各组分的甲硫氨酸含量均显著高于低甲硫氨酸类型品种的对应该组分的甲硫氨酸含量, 在这两种类型花生中伴花生球蛋白 II 都是甲硫氨酸含量最高的组分。探讨了 17.5 kDa 高甲硫氨酸多肽在花生种子发育过程中的合成规律。

**关键词:** 花生种子; 氨基酸组成; 17.5 kDa 多肽

中图分类号: Q565.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2000)04-0339-07

## COMPOSITION OF AMINO ACID IN STORAGE PROTEINS AND CHANGES IN 17.5 kDa POLYPEPTIDE SYNTHESIS DURING PEANUT SEED DEVELOPMENT

LU Chun-bin<sup>1</sup>, HUANG Shang-zhi<sup>2</sup>, TANG Xue-jun<sup>2</sup>, FU Jia-ru<sup>2</sup>

(1. Center for Reproductive Immunology Research, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Department of Bioscience and Biotechnology, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** Three major components of salt-soluble proteins in peanut seeds were roughly purified on Sephadex G-100 gel filtration. Five purified polypeptides, 60.5, 41, 38.5, 18 and 17.5 kDa polypeptides, were harvested with high purity and productivity. Amino acid composition of the three major components (arachin, conarachin I and conarachin II) and the five purified polypeptides were analyzed. It was shown that 17 amino acids, including 7 essential amino acids, were detectable. The contents of asparatic acid, glutamic acid and arginine were high, whereas methionine and cysteine were extremely low. The methionine levels of three major components in methionine-rich cultivar Shanyou 523 were obviously higher than those in cultivar Haihua 1. The methionine level of conarachin II in three major components was the highest in the two cultivars. Results showed that highest methionine in 17.5 kDa polypeptide was observed in the five purified polypeptides. Western blot showed synthetic changes in 17.5 kDa polypeptide during development of peanut seeds.

**Key words:** Peanut seed; Amino acid composition; 17.5 kDa polypeptide

收稿日期: 1999-11-12

基金项目: 广东省自然科学基金(950090)资助项目

花生种子蛋白含量高, 含有 18 种氨基酸, 是人和动物的理想植物蛋白来源。但甲硫氨酸匮乏是限制花生种子蛋白有效利用的重要因素<sup>[1-3]</sup>。已有的一些研究表明不同品种花生种子的蛋白质含量和组成存在着明显差异, 而且各种蛋白质组分的含硫氨基酸含量也有较大差异<sup>[3-5]</sup>。黎茵等<sup>[1]</sup>对中国花生 5 种不同类型的 46 个品种的种子蛋白质进行电泳分析, 发现存在 4 种蛋白质多肽组成类型, 而且不同蛋白质组成类型的种子氨基酸含量存在显著差异。迄今为止, 有关花生种子贮藏蛋白多限于不同品种花生中甲硫氨酸含量的分析和比较, 而对其种子贮藏蛋白中的高甲硫氨酸蛋白的分离纯化及氨基酸含量和组成的研究报道不多<sup>[1-3, 6-8]</sup>。研究花生种子贮藏蛋白的多肽组成及其氨基酸含量, 分离纯化高甲硫氨酸蛋白, 阐明高甲硫氨酸蛋白合成规律, 对提高其营养品质有重要的意义。

本研究分析了两种不同蛋白质类型花生种子蛋白质主要组分的氨基酸组成: 纯化得到高甲硫氨酸类型—汕油 523 种子贮藏蛋白的 5 种主要多肽, 分析了它们的氨基酸组成; 对 17.5 kDa 多肽在发育过程中的合成规律进行了研究。

## 1 材料和方法

**材料** 花生 (*Arachis hypogaea* L.) 品种汕油 523, 1997 年、1998 年种植于广东省农业科学院试验田内, 开花后记录果针入土天数 (DAP, days after pegging), 在规定时间内采收、挑选发育一致的荚果。海花 1 号由山东省花生研究所提供。

**贮藏蛋白的提取及初步纯化** 参照 Yamada 等<sup>[9]</sup>方法提取种子贮藏蛋白的花生球蛋白。伴花生球蛋白 I 和伴花生球蛋白 II 的制备, 按 Mosse 和 Pernollet<sup>[10]</sup>的方法进行。以上 3 种蛋白组分经过 Sephadex G-100 初步纯化, 收集蛋白峰。PEG-1000 浓缩后, 以制备电泳再次纯化。

**SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳** 参照 J. 萨姆布鲁克等<sup>[11]</sup>的方法制备 SDS-PAGE 不连续缓冲系统的平板凝胶, 分离胶浓度为 12.5%; 浓缩胶 4%。恒流电泳后以 0.25% 考马斯蓝 R-250 染色, 7% 乙酸脱色至背景无色。标准蛋白 (上海丽珠东风生物技术公司) 分子量范围为 14.4—97.4 kDa 的 6 种多肽。

**SDS-PAGE 分离样品的回收** 制备性 SDS-PAGE 电泳的胶规格为 115 mm×140 mm×3 mm, 分离胶为 6%—18% 连续梯度聚丙烯酰胺凝胶。加样量为 10—20 mg。电泳后同上法染色和脱色后。将各蛋白带切下, 装入透析袋中, 电泳洗脱数次电泳后切下的凝胶条, 上清液加入 4 倍体积的冷丙酮 -20℃ 低温过夜, 离心后收集沉淀, 得到纯化的多肽。

**氨基酸组成测定** 采用酸水解法<sup>[1]</sup>。由于酸水解对色氨酸的破坏, 在计算蛋白质含量时进行了校正。

**Western Blot 分析** 参照 J. 萨姆布鲁克等<sup>[11]</sup>的方法进行, SDS-PAGE 所上样品为按 Mosse 和 Pernollet<sup>[10]</sup>的方法提取的伴花生球蛋白 II 粗制品, 兔抗 17.5 kDa 多肽第一抗体为本试验中制备, 酶标第二抗体即羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶 (北京天象人生物工程有限公司, 工作浓度为 1:1000), 酶反应底物为 TMB、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。

**蛋白含量的测定** 按照 Bradford<sup>[12]</sup>的方法, 用牛血清蛋白 (北京天象人生物工程有限公司) 作标准曲线。

## 2 结果

### 2.1 花生种子贮藏蛋白中盐溶蛋白各组分的氨基酸

氨基酸组成分析发现, 汕油 523 中花生子叶总蛋白的甲硫氨酸含量为  $14.61 \text{ mg g}^{-1}$  氨基酸, 而海花 1 号子叶总蛋白的甲硫氨酸含量为  $11.24 \text{ mg g}^{-1}$  氨基酸, 前者的甲硫氨酸含量比后者的高 29.9%。

对这两个品种花生子叶总蛋白的 3 个主要组分的氨基酸组成分析结果表明(表 1), 在它们的 3 个主要组分中, 天冬氨酸、苏氨酸、谷氨酸、缬氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、精氨酸、脯氨酸无显著变化, 其中天冬氨酸, 谷氨酸和精氨酸含量最高, 三者可达总量的 45%。天冬氨酸在不同品种和同一品种的各个组分中, 含量高而恒定。这两个品种的甲硫氨酸水平均较低, 在各个组分中变化也较大, 伴花生球蛋白 II 的甲硫氨酸含量最高, 伴花生球蛋白 I 次之, 花生球蛋白最低; 在汕油 523 中伴花生球蛋白 II 的甲硫氨酸含量是花生球蛋白的 2.63 倍, 是伴花生球蛋白 I 的 1.85 倍。海花 1 号也具有相同的规律, 只是其各组分的甲硫氨酸水平明显低于汕油 523 的水平。

表 1 两个花生品种贮藏蛋白各组分的氨基酸组成分析(单位:  $\text{mg g}^{-1}$  氨基酸)

Table 1 Amino acid ( $\text{mg g}^{-1}$ ) composition of 3 major components in peanut seeds of two cultivars

氨基酸 Amino acid	汕油 523 Shanyou 523			海花 1 号 Haihua 1		
	花生球蛋白 Arachin	伴花生球蛋白 I Conarachin I	伴花生球蛋白 II Conarachin II	花生球蛋白 Arachin	伴花生球蛋白 I Conarachin I	伴花生球蛋白 II Conarachin II
Asp	133.35	126.82	138.27	131.48	129.13	137.34
Thr*	26.27	32.57	21.71	25.53	25.61	24.96
Ser	33.79	33.52	41.20	37.01	31.73	38.39
Glu	208.52	183.70	283.80	210.58	217.55	213.85
Gly	58.32	51.76	33.67	39.31	46.92	59.64
Ala	48.53	53.52	21.07	46.47	41.70	43.97
Val*	55.22	67.43		52.81	55.02	49.81
Cys				2.60		8.69
Met*	9.72	13.88	25.64		5.71	9.15
Ile*	42.27	49.28	29.43	42.20	46.92	37.69
Leu*	73.38	80.96	68.51	74.97	67.27	66.03
Tyr	47.85	42.08	7.71	45.92	13.66	36.85
Phe*	64.96	69.06	25.47	69.29	56.82	25.38
Lys*	25.78	42.45	29.25	25.33	60.48	38.17
His	18.52	19.26	12.64	24.02	29.16	25.57
Arg	108.55	90.63	158.52	126.44	133.09	138.72
Pro	49.88	44.59	33.14	45.97	44.82	43.80

\* 必需氨基酸 Essential amino acid

### 2.2 5 种纯化多肽的氨基酸组成

以制备电泳并结合电泳洗脱对花生(汕油 523)贮藏蛋白 3 种主要组分花生球蛋白, 伴花生球蛋白 I 和 II 进一步分离得到它们的一些组成亚基, 其中 60.5 kDa 亚基属伴花生球蛋白 I 的组成

亚基, 41、38.5 kDa 属花生球蛋白的组成亚基, 17.5 kDa 则属伴花生球蛋白 II。这 5 种多肽经过上述纯化后已达到高纯度(SDS-PAGE 只有一条带)(图 1)。

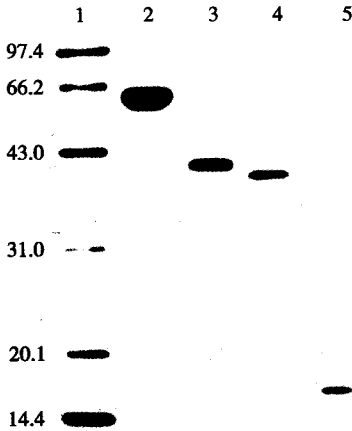


图 1 5 种纯化多肽的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE of five purified polypeptides in peanut seeds  
1. 标准蛋白, 上样量 50  $\mu$ g: 97.4 kDa (兔磷酸化酶 B)、66.2 kDa (牛血清蛋白)、43 kDa (兔肌动蛋白)、31 kDa (牛碳酸酐酶)、20.1 kDa (胰蛋白酶抑制剂)、14.4 kDa (鸡蛋清溶菌酶); 2. 60.5 kDa 多肽, 80  $\mu$ g; 3. 41 kDa 多肽, 80  $\mu$ g; 4. 38.5 kDa 多肽, 50  $\mu$ g; 5. 18 kDa 多肽, 30  $\mu$ g; 6. 17.5 kDa 多肽, 30  $\mu$ g.  
1. Protein markers (50  $\mu$ g): 97.4 kDa (Rabbit phosphorylase B), 66.2 kDa (Bovine serum albumin), 43 kDa (Rabbit actin), 31 kDa (Bovine carbonic anhydrase), 20.1 kDa (Trypsin inhibitor), 14.4 kDa (Lysozyme, Egg white); 2. 60.5 kDa polypeptide (80  $\mu$ g); 3. 41 kDa polypeptide (80  $\mu$ g); 4. 38.5 kDa polypeptide (50  $\mu$ g); 5. 18 kDa polypeptide (30  $\mu$ g); 6. 17.5 kDa polypeptide (30  $\mu$ g).

同这两个品种花生子叶蛋白的 3 个主要组分一样, 这 5 种多肽的天冬氨酸、苏氨酸、谷氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、精氨酸、脯氨酸含量和组成也无显著差异, 其中天冬氨酸、谷氨酸和精氨酸是它们最主要的组成氨基酸, 三者之和可达总量的 45% 甚至更高, 而这 5 种多肽的 7 种必需氨基酸(色氨酸未计入)中, 除了甲硫氨酸水平较低外, 其余 6 种必需氨基酸均达到或超出联合国粮农组织的食用标准(表 2)。在这 5 个多肽中甲硫氨酸变

表 2 5 种纯化的汕油 523 贮藏蛋白多肽的氨基酸组成分析(单位: mg g<sup>-1</sup> 氨基酸)

Table 2 Amino acid (mg g<sup>-1</sup>) composition of five purified polypeptides in peanut seeds of cultivar Shanyou 523

氨基酸 Amino acid	60.5 kDa	41 kDa	38.5 kDa	18 kDa	17.5 kDa
Asp	116.49	111.55	116.79	153.71	120.48
Thr*	33.36	23.27	30.50	30.01	27.42
Ser	38.32	35.82	33.77	41.23	39.59
Glu	196.58	173.37	219.59	129.96	184.27
Gly	76.23	169.05	72.55	62.59	121.60
Ala	50.44	41.07	50.08	62.20	40.02
Val*	48.72	53.98	45.83	69.39	55.63
Cys	8.53	5.56	7.66	9.77	9.63
Met*	12.55	11.49	9.84	8.67	16.98
Ile*	40.96	41.50	36.74	48.45	43.58
Leu*	64.95	56.28	64.19	90.55	58.49
Tyr	40.65	14.99	41.98	52.52	17.16
Phe*	60.51	53.48	60.15	54.06	48.58
Lys*	32.18	42.95	26.92	38.59	44.49
His	13.31	6.42	12.01	17.92	11.59
Arg	122.46	110.14	132.41	81.29	112.48
Pro	43.71	49.01	46.57	49.06	47.91

\* 必需氨基酸 Essential amino acid

化较大,其中17.5 kDa多肽的含量最高,半胱氨酸水平也较高,但17.5 kDa多肽(伴花生球蛋白II的一个主要多肽)的甲硫氨酸水平仍低于伴花生球蛋白II甲硫氨酸的总水平。伴花生球蛋白I的60.5 kDa多肽甲硫氨酸含量也较高,而花生球蛋白的41、38.5 kDa亚基的甲硫氨酸水平明显低于伴花生球蛋白I和伴花生球蛋白II的甲硫氨酸水平。

### 2.3 发育过程中伴花生球蛋白II的积累及17.5 kDa多肽的合成变化

花生种子发育过程中伴花生球蛋白II的含量分析表明,发育早期(20-25 DAP前)花生种子伴花生球蛋白II的含量水平极低,25 DAP时其含量仅为 $0.95 \text{ mg g}^{-1}$ 脱脂粉;而25 DAP以后其含量迅速提高,在30 DAP时即提高到 $2.75 \text{ mg g}^{-1}$ 脱脂粉,达到发育后期(70 DAP)57%;虽然发育中期(30 DAP)以后伴花生球蛋白II的合成速率有所减慢,但在45 DAP以后又有较快增加(图2),并且其合成一直持续到成熟后期。

与之对应,发育过程中伴花生球蛋白II中组成多肽—17.5 kDa多肽合成的Western blot分析表明(图3),30 DAP以前的花生种子中,几乎检测不到17.5 kDa多肽,30 DAP以后,此多肽开始大量积累,并且这种积累主要是由于17.5 kDa多肽新合成的结果,35 DAP直至完全成熟(75-80 DAP),是花生种子发育的最旺盛时期,Western blot分析表明17.5 kDa多肽在此过程中大量合成。

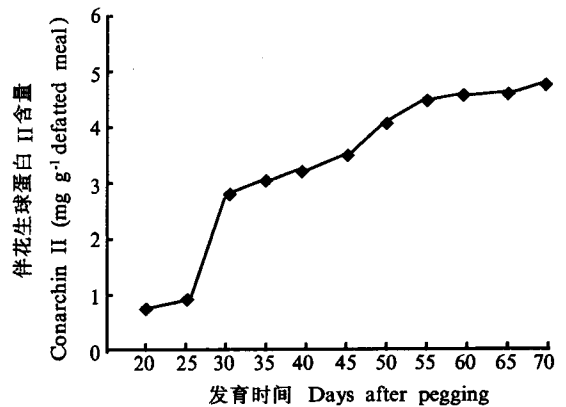


图2 不同发育时间种子伴花生球蛋白II的合成变化

Fig. 2 Synthetic change in conarachin II during development of peanut seeds

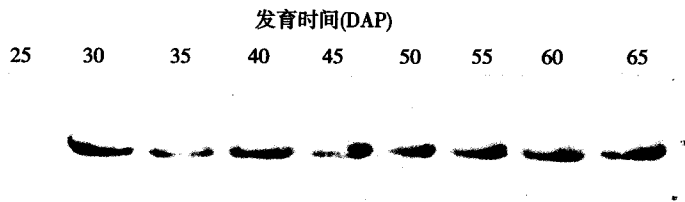


图3 在种子不同发育时间伴花生球蛋白II中的17.5 kDa多肽的合成变化

Fig. 3 Synthesis of 17.5 kDa polypeptide in conarachin II during peanut seed development

不同发育时间伴花生球蛋白II的上样量 Loading amount of conarachin II at different days after pegging (DAP) is indicated as follows: 25 DAP:  $80 \mu\text{g}$ ; 30 DAP:  $80 \mu\text{g}$ ; 35 DAP:  $80 \mu\text{g}$ ; 40 DAP:  $50 \mu\text{g}$ ; 45 DAP:  $50 \mu\text{g}$ ; 50 DAP:  $30 \mu\text{g}$ ; 55 DAP:  $30 \mu\text{g}$ ; 60 DAP:  $30 \mu\text{g}$ ; 65 DAP:  $30 \mu\text{g}$ .

### 3 讨论

近期我们对国内 36 个高蛋白(种子蛋白质含量在 30% 以上)花生品种进行了种子蛋白质组成分析和氨基酸含量测定,结果与黎茵等的研究报道一致<sup>[1]</sup>。因此本实验选取汕油 523(高甲硫氨酸品种类型)和海花 1 号(低甲硫氨酸品种类型)进行氨基酸组成研究,并分离纯化高甲硫氨酸蛋白。

汕油 523 的子叶总蛋白中的甲硫氨酸含量比海花 1 号高得多,但其种子蛋白的甲硫氨酸仍然匮乏。纯化的汕油 523 和海花 1 号子叶蛋白的 3 个主要组分及高甲硫氨酸类型品种(汕油 523) 5 种高纯度的多肽的氨基酸组成中,天冬氨酸、苏氨酸、谷氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、精氨酸、脯氨酸无显著变化,这些氨基酸保守性强,是种子贮藏蛋白的各主要组分及其多肽的基本结构组分,对维持各多肽的结构有重要意义。这两个品种花生子叶总蛋白的各组分中,除甲硫氨酸外的其它 7 种必需氨基酸均达到食用标准。汕油 523 各组分的甲硫氨酸含量均显著高于海花 1 号的对应组分的甲硫氨酸含量,也说明不同蛋白质组成类型的种子其氨基酸含量的显著差异均体现在花生球蛋白、伴花生球蛋白 I 和伴花生球蛋白 II 中;这两种不同蛋白质组成类型花生中,甲硫氨酸含量在花生球蛋白,伴花生球蛋白 I 和 II 中依次显著提高,伴花生球蛋白 II 均是花生子叶总蛋白中的主要高甲硫氨酸组分。这与 Basha 等<sup>[3-5]</sup>报道的小分子伴花生球蛋白 II(2S 蛋白)是花生中的甲硫氨酸丰富的蛋白质的结果一致。与之对应,汕油 523 伴花生球蛋白 II 的 17.5 kDa 多肽的甲硫氨酸含量最高,伴花生球蛋白 I 的 60.5 kDa 多肽甲硫氨酸含量次之,而花生球蛋白的 41、38.5 kDa 亚基的甲硫氨酸水平明显低于前两者,表明汕油 523 各组分的甲硫氨酸含量差异是其组成多肽的氨基酸组成所决定的。汕油 523 伴花生球蛋白 II 的甲硫氨酸水平超出了联合国粮农组织的标准(22 mg 甲硫氨酸 g<sup>-1</sup> 氨基酸),并且高于其 17.5 kDa 多肽的甲硫氨酸水平,表明在伴花生球蛋白 II 的多肽中,还存在甲硫氨酸水平更高的多肽(其它高甲硫氨酸的纯化正在进行)。

Basha<sup>[6,8]</sup>报道了花生种子成熟过程中子叶蛋白质(包括少数几个小分子 MRP)双向电泳谱的变化。黄上志<sup>[12]</sup>报道了在整个发育过程中,花生球蛋白的 4 个主要亚基及伴花生球蛋白 I 的 60.5 kDa 亚基在成熟初期(20 DAP)即开始出现,至发育后期其含量明显增加。本研究中对花生种子发育过程中伴花生球蛋白 II 的含量分析表明,发育早期(20-25 DAP 前)的花生种子中的伴花生球蛋白 II 含量水平极低,也没有合成 17.5 kDa 多肽。30 DAP 时伴花生球蛋白 II 含量有大幅度的提高,17.5 kDa 多肽 35 DAP 时才开始出现,并迅速积累,因此 17.5 kDa 多肽的积累是蛋白质新合成的结果。该蛋白的积累起始略迟于花生球蛋白的 4 个主要亚基和伴花生球蛋白 I 60.5 kDa 亚基的合成,证实贮藏蛋白各多肽在发育过程中是在不同空间以不同时间和不同的速率合成的<sup>[6]</sup>。而且发育中期(30 DAP)到成熟后期,种子一直进行着旺盛的伴花生球蛋白 II 合成,尤其是 45 DAP 以后较快增加。Western blot 分析表明 17.5 kDa 多肽的合成与伴花生球蛋白 II 的合成一致。

#### 参考文献:

- [1] 黎茵,黄上志,傅家瑞.不同品种花生种子蛋白质的电泳分析[J].植物学报,1998,40(6):534-541.

- [2] Bewley J D, Black M. Seed development and maturation [A]. In: Bewley J D, Black M. Seeds: Physiology of Development and Germination [M]. New York: Plenum Press, 1994, 35-116.
- [3] Heinis J L. Methionine content of 25 peanut selections and effect of molybdenum on methionine and nitrogen in peanut plants [J]. Proc Am Peanut Res Educ Assoc, 1971, 3:52-56.
- [4] Pancholy S K, Deshpande A S, Kall S. Amino acid, oil and protein content of some selected peanut cultivars [J]. Proc Am Peanut Res Educ Assoc, 1978, 10:30-34.
- [5] Young C T. Amino acid composition of peanut (*Arachis hypogea* L.) sample from the 1973 and 1974 uniform peanut performance tests [J]. Proc Am Peanut Res Educ Assoc, 1979, 11:24-27.
- [6] Basha S M M. Identification of cultivar differences in seed polypeptide composition of peanut by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis [J]. Plant Physiol, 1979, 63:301-306.
- [7] Basha S M M, Pancholy S K. Identification of methionine-rich polypeptides in peanut (*Arachis hypogea* L.) seed [J]. J Agric Food Chem, 1981, 29:331-335.
- [8] Basha S M M. Deposition pattern of methionine-rich protein in peanuts [J]. J Agric Food Chem, 1991, 39:88-91.
- [9] Yamada T, Aibara S, Morita Y. Accumulation pattern of arachin and its subunits in maturation of groundnut seeds [J]. Plant Cell Physiol, 1980, 21:1217-1226.
- [10] Mosse J, Pernollet J C. Storage Proteins of Legume Seeds [A]. In: Arora S K. Chemistry and Biochemistry of Legumes [M]. Delhi, Edward Arnold, 1982, 119-193.
- [11] J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 分子克隆实验指南 [M]. 第二版, 北京: 科学出版社, 1992, 853-907.
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72:248-254.
- [13] 黄上志, 傅家瑞. 花生种子的发育与贮藏蛋白质的合成和积累 [J]. 植物生理学报, 1992, 18(2):142-150.