

# 花生蛋白质的主要种类和等电点的研究\*

## Studies on Main Kinds and Isoelectric Points of Peanut Proteins

韦一能      陈元发      陈全斌      陈国汉  
Wei Yineng    Chen Yuanfa    Chen Quanbin    Chen Guohan

(广西师范大学 桂林市三里店 541004)  
(Guangxi Normal University, Sanlidian, Guilin, 541004)

**摘要** 花生蛋白等电聚焦显 11 条区带, 其中 6 条很明显, 说明花生至少有 11 类不同等电点的蛋白质。等电点分别为 4.3、4.5、5.1、5.4、6.5、6.7 的蛋白质是主要的, 他们的聚丙烯酰胺凝胶电泳和花生蛋白乳状液的醋酸纤维薄膜电泳的结果都有 3 条区带, 其中两条比较明显, 说明花生蛋白有两种主要组分和一种次要组分; 这三种组分可有多种等电点, 一种等电点可同时有这三种组分。

**关键词** 花生蛋白 蛋白种类 等电点

**Abstract** Peanut proteins appear 11 strips in isoelectrofocusing electrophoresis of which 6 strips with isoelectric points 4.3, 4.5, 5.1, 5.4, 6.5, 6.7 respectively are very obvious, indicating that peanut proteins have at least 11 kinds of proteins with different isoelectric points and 6 kinds are main. These six proteins show 3 same strips with two obvious in both the PAGE and the acetic acid fiber thin film electrophoresis of peanut protein emulsion, indicating that the peanut proteins contain two major components and one sub-major component. These three components could have many different isoelectric points while one isoelectric point could be seen in these three components at the same time.

**Key words** peanut protein, protein kinds, isoelectric point

关于花生种子中蛋白质(以下称花生蛋白)的主要种类和等电点(*PI*)的研究, 虽然已有不少报道, 但由于可能使用方法的差异、实验条件的差异以及分类依据的不同等原因, 因此所得的结果不很一致。例如, 关于花生蛋白的主要种类, 有的认为有 3 种组分<sup>[1]</sup>, 有的认为有 4 种<sup>[2]</sup>, 有的认为有 6 种<sup>[3]</sup>, 还有的认为有 4 种是主要的, 6 种是次要的<sup>[4]</sup>; 关于等电点的报道, 有的认为是 4.0<sup>[5]</sup>, 有的认为是 4.5<sup>[6]</sup>, 还有的认为是 4.5~5.0<sup>[7]</sup>。为了较全面而深入地认识花生蛋白的主要种类和等电点, 我们采用聚丙烯酰胺凝胶电泳、醋酸纤维薄膜电泳、等电聚焦和等电聚焦后分别取不同等电点的蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和 SDS-PAGE 分析, 研究花生蛋白的主要种类和等电点, 为花生蛋白资源的开发利用和生

理功能等方面的研究, 寻找有关基础资料。

### 1 材料与方法

1.1 材料及蛋白质提取 供试材料有粤油 116、油油 527 等。花生果经人工剥壳, 去掉红衣和胚, 并研磨成粉。称取花生粉数克, 加入 4~5 倍体积的提取缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 值 8.3), 于研钵中研磨成浆, 离心(5000 g) 15 min, 去掉沉淀和上浮的奶油层, 取乳状液备用。

1.2 电泳 花生蛋白提取后, 乳状液直接进行等电聚焦、PAGE、醋酸纤维薄膜电泳, 以及等电聚焦后, 分别取未经固定染色的凝胶柱上的 6 种不同等电点的蛋白质, 分别进行 PAGE 和 SDS-PAGE 分析。等电聚焦的具体操作和等电点测定基本上按照文献[8]的方法进行; PAGE 基本上按文献[9]的方法进行。分离胶的浓度为 10% 左右, 配胶缓冲液为 Tris-HCl 缓冲体系, pH 值 8.9。免去浓缩胶, 样品直接加

1995-05-03 收稿。

\* 国家自然科学基金资助课题。

在分离胶上。电极缓冲液为高浓度的 Tris-甘氨酸缓冲液, pH 值 8.3。电泳 2 h 左右。SDS-PAGE 的具体操作按照文献 [10] 的方法进行, 分离胶浓度为 11.5%, pH 值 8.8。浓缩胶的浓度为 4.5%, pH 值 6.8。稳压在 160 V/12 管; 醋酸纤维薄膜电泳的具体操作基本上按文献 [8] 的方法进行。

**1.3 染色** 等电聚焦结束后, 凝胶柱用 12% TCA 固定 2 h, 用考马斯亮蓝 R<sub>250</sub> 染色液 (考马斯亮蓝 R<sub>250</sub> 0.2 g, 加入 50% 甲醇 91 mL, 冰乙酸 9 mL)。用洗脱液 (乙醇: 冰乙酸: 水 = 25: 10: 65) 脱色<sup>[8]</sup>; PAGE 结束后, 凝胶柱置于 0.1% 考马斯亮蓝 R<sub>250</sub> 的 7% 乙酸溶液染色过夜, 用 7% 乙酸溶液漂洗并保存<sup>[9]</sup>; SDS-PAGE 结束后, 凝胶柱用固定液 (25% 异丙醇-10% 乙酸溶液) 固定 3 h 以上, 最好过夜, 然后用考马斯亮蓝 R<sub>250</sub> 染色液 (0.15 g 考马斯亮蓝 R<sub>250</sub> 溶解于 100 mL 的固定液中) 染色 2~3 h, 用 10% 乙酸溶液漂洗并保存<sup>[11]</sup>。凝胶柱所显出的区带用岛津 CS-910 双波长 TLC 扫描仪进行扫描; 醋酸纤维薄膜电泳后, 用 0.2% 氨基黑 10 B 的 7% 乙酸溶液染色 10 min, 用 7% 乙酸溶液漂洗。

## 2 结果

**2.1 花生蛋白乳状液的醋酸纤维薄膜电泳结果** 如图 1 所示。结果表明, 花生蛋白乳状液经醋酸纤维薄膜电泳, 在膜上可显出 3 条区带, 其中泳动最快的一条最为明显, 其次是泳动最慢的一条, 而中间一条很细小。三条带之间的距离很近。有时往往只看到两条。



图 1 花生蛋白乳状液醋酸纤维薄膜电泳示意图

Fig. 1 The graph of acetic acid fiber thin film electrophoresis of peanut protein emulsion

**2.2 花生蛋白提取后, 蛋白乳状液直接进行等电聚焦电泳分析结果** 如图 2 所示。结果表明, 在凝胶柱上显出 11 条区带, 为了便于后面的叙述, 所显出的区带由正极端向负极端按顺序进行编号, 它们离正极端的距离及等电点见表 1。所显出的 11 条区带中, 第 1、2、4、6、7、9 等六条区带 (其等电点分别为 4.3、4.5、5.1、5.4、6.5、6.7) 比较明显, 尤其是第 6 条区带特别明显; 第 3、5、8 三条区带为扩散带; 第 10、11 两条为很细的带。

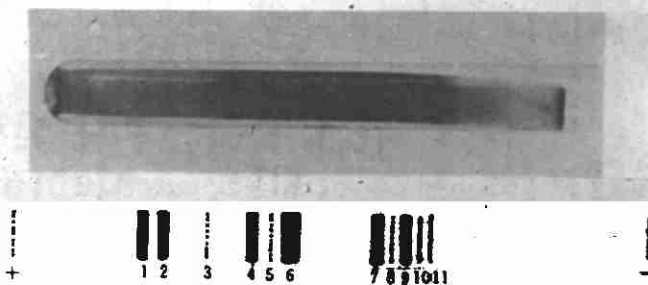


图 2 花生蛋白乳状液等电聚焦电泳图

Fig. 2 The graph of isoelectrofocusing electrophoresis of peanut protein emulsion

表 1 花生蛋白等电聚焦电泳区带离正极端的距离及等电点  
Table 1 The distance of peanut protein isoelectrofocusing electrophoresis zones from positive electrode and isoelectric points

区带编号 Zone no.	离正极端距离 (mm) Distance of zone from positive electrode	等电点 (PI) Isoelectric points
1*	8	4.3
2*	20	4.5
3	25	4.8
4*	31	5.1
5	33	5.3
6**	35	5.4
7*	50	6.5
8	53	6.6
9*	56	6.7
10	57	6.8
11	59	6.9

\* 明显区带 Obvious zone; \*\* 特别明显区带 Peculiarly obvious zone

**2.3 花生蛋白经等电聚焦后, 分别取凝胶柱上的 6 条主要区带 (PI 分别为 4.3、4.5、5.1、5.4、6.5、6.7) 的蛋白质, 进行 PAGE, 结果如图 3 所示。实验结果表明, 6 类不同等电点的蛋白质, 经 PAGE 后, 共显出 12 条区带。所显出区带由正极端向负极端按顺序进行编号。它们在本实验条件下的迁移率分别为 0.70、0.67、0.61、0.57、0.52、0.49、0.46、0.41、0.36、0.30、0.18、0.14。在所显出的 12 条区带中, 第 7、8、9、10 四条区带比较明显, 尤其是第 8、10 两条区带特别明显, 而其他区带均很细小。6 种不同等电点的蛋白质都显出 8、9、10 三条区带, 其中第 8、10 两条都很明显。不同的是, pH 值为 5.1 的 3 条区带比较细小; 第 10 条区带在 PI 从 4.3 到 5.1 有逐**

步下降趋势,而  $PI$  从 5.4 到 6.7 则有逐步上升趋势。除了这三条区带在不同等电点的蛋白质中普遍存在外,其他区带往往只在个别等电点的蛋白质中出现,第 1、2 两条带只分别在  $PI$  为 4.5、4.3 的蛋白质中显出,而且只是隐约可见;第 4、5、6 三条区带,也只在  $PI$  为 5.1、5.4 中存在,但也是不很明显的;第 7 条区带虽然比较明显,但也仅存在于  $PI$  为 5.1 的蛋白质中;第 11 条区带仅在  $PI$  为 4.3、4.5、5.1 的蛋白质中存在,第 12 条区带在  $PI$  为 4.3、4.5 中存在,但这两条区带只在  $PI$  为 4.3 蛋白质中稍明显外,

其余只是隐约可见。

2.4 经等电聚焦后,分别取未经固定染色的凝胶柱上的 6 条主要区带的蛋白质 ( $PI$  分别为 4.3、4.5、5.1、5.4、6.5、6.7),进行 SDS-PAGE,结果如图 4、图 5 所示。根据 6 类不同等电点的蛋白质所显出的区带在凝胶柱上的分布情况,由正极端向负极端可明显分为 A、B、C、D 四个区域。各区域及区带与花生蛋白乳状液直接进行 SDS-PAGE 结果基本上是一致的<sup>[11]</sup>。在所显出的区带中,  $B_1$ 、 $D_3$  区带最为明显,其次为  $B_2$ 、 $B_3$ 、 $C_3$ 、 $C_4$ 、 $C_6$  等区带,其余区带比较细

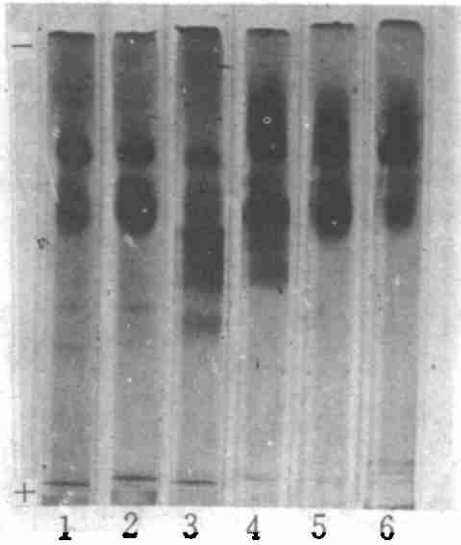


图 3 不同等电点的花生蛋白 PAGE 图

Fig. 3 The PAGE graph of peanut proteins with different isoelectric points

1.  $PI = 4.3$ ; 2.  $PI = 4.5$ ; 3.  $PI = 5.1$ ; 4.  $PI = 5.4$ ; 5.  $PI = 6.5$ ; 6.  $PI = 6.7$

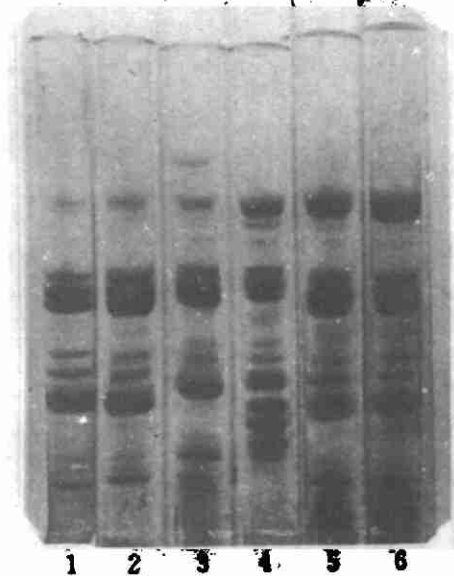


图 4 不同等电点的花生蛋白的 SDS-PAGE 图

Fig. 4 The SDS-PAGE graph of peanut proteins with different isoelectric points

1.  $PI = 4.3$ ; 2.  $PI = 4.5$ ; 3.  $PI = 5.1$ ; 4.  $PI = 5.4$ ; 5.  $PI = 6.5$ ; 6.  $PI = 6.7$

小。不同等电点的蛋白质相比,所显出的主要区带基本相同,即A<sub>1</sub>、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>6</sub>、D<sub>3</sub>等区带在6类不同等电点的蛋白质中都存在,而且除D<sub>3</sub>区带外,其余区带的含量一般无明显的规律性差异(见图4、图5和表2)。不同等电点蛋白质的主要差异是,D<sub>3</sub>区带在不同等电点的蛋白质中差异比较明显,等电点较低,D<sub>3</sub>区带的蛋白质含量较低,反之则较高;等电点为5.4的蛋白质的A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>、A<sub>4</sub>等区带很明显,而其他等电点的蛋白质则未见显出。

### 3 讨论

花生蛋白乳状液的醋酸纤维薄膜电泳可显出三条区带,其中有两条比较明显,中间一条比较细小,有时甚至只看到两条;花生蛋白乳状液的等电聚焦后,分别取凝胶柱上未经固定染色的6条主要区带的蛋白质,进行PAGE,结果共同显出8、9、10三条明显区带,而其他区带仅在个别等电点的蛋白质中出现,而且多数只是隐约可见。这说明6类不同等电点

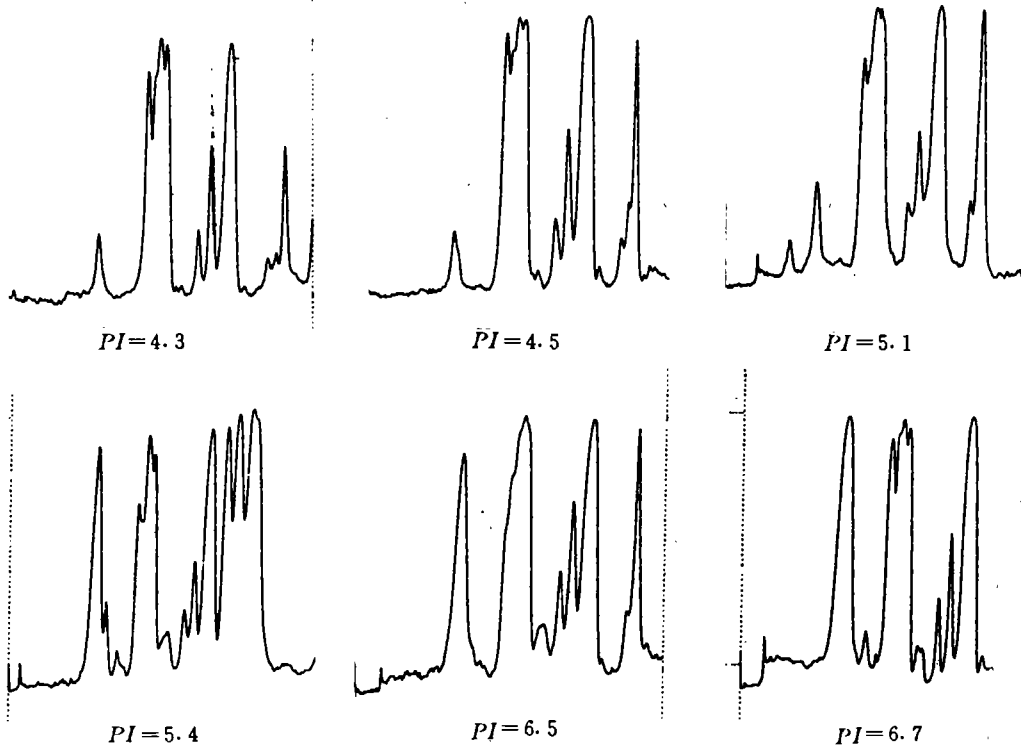


图5 不同等电点的花生蛋白 SDS-PAGE 的光密度扫描曲线

Fig. 5 Optical density scan curves of SDS-PAGE graph of peanut proteins with different isoelectric points

表2 不同等电点的花生蛋白的主要区带的蛋白质含量

Table 2 Protein contents of main areas in peanut proteins with different isoelectric points

等电点 Isoelectric points	蛋白质含量 Proteins contents (%)							
	A <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>6</sub>	D <sub>3</sub>
4.3	6.9	21.5	6.1	3.3	9.4	18.6	12.7	4.3
4.5	10.5	22.6	6.5	3.6	10.0	16.6	12.7	5.4
5.1	13.2	24.1	6.6	4.0	11.1	15.9	9.4	7.1
5.4	19.1	12.0	3.6	2.9	7.2	7.8	5.8	9.8
6.5	9.3	19.6	7.6	4.9	10.5	12.7	9.8	17.3
6.7	8.3	22.4	8.1	4.8	8.6	12.8	7.4	27.2

的蛋白质的 PAGE 所显出的第 8、9、10 三条区带以及醋酸纤维薄膜电泳所显的三条区带的蛋白质是花生蛋白的主要天然组分。根据这三条区带在凝胶柱和薄膜上的显现程度，可以认为，在这三种组分中，有两种是主要的，一种是次要的。6 类不同等电点的花生蛋白的 SDS-PAGE 结果共同显出 A<sub>1</sub>、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>6</sub>、D<sub>3</sub> 等主要区带。说明不同等电点的花生蛋白共同具有相同的亚基（或肽链）。

关于花生蛋白等电点的测定，1942 年，Macheboeuf 和 Tayeau<sup>[12]</sup>利用盐的浓度与 pH 值对蛋白质溶解度的影响，估算过花生球蛋白和伴花生球蛋白的等电点分别为 5.2 和 3.5；1952 年，Johnson<sup>[13]</sup>利用电泳迁移率与 pH 值的关系测定过伴花生球蛋白 I 和伴花生球蛋白 II 的等电点，分别为 5.5 和 7.1。而利用等电聚焦电泳技术测定花生蛋白的等电点则未见有过报道。我们利用等电聚焦电泳法分析花生蛋白乳状液时，结果显出 11 条区带，其中有 6 条是比较明显的。因此，从等电点的角度看，花生至少有 11 类不同等电点的蛋白质，其中有 6 类是主要的，它们的等电点分别为 4.3、4.5、5.1、5.4、6.5、6.7。但我们未分离出等电点为 3.5 和 7.1 的蛋白质。

从花生蛋白等电聚焦后的 PAGE、SDS-PAGE 结果看，花生蛋白的等电点具有特殊性，即花生蛋白的 3 种组分可具有多个等电点，而 1 个等电点可同时具有这 3 种组分。花生蛋白的等电点为何具有这种特殊性？还有待于进一步的研究。从不同等电点的花生蛋白的 SDS-PAGE 结果看，所显出的主要区带基本上是相同的，不同的是，不同等电点的蛋白质，D<sub>3</sub> 区带的蛋白亚基（或肽链）的差异比较明显，而且具有一定的规律性，即等电点较高，则含量较高，反之则较低，这说明 D<sub>3</sub> 区带的蛋白亚基（或肽链）能使由相同的亚基或肽链组成的蛋白质表现出不同的等电点。花生蛋白的等电点除了由肽链本身的电离基团所决定外，还受到 D<sub>3</sub> 亚基（或肽链）的影响和控制。A 区域的 A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>、A<sub>4</sub> 区带只在等电点为 5.4 的蛋白质中出现，而在其他等电点的蛋白中则未见显出，说明 A 区域的这些区带的蛋白质的等电点不受 D<sub>3</sub> 亚基或肽链的影响和控制。可能由于 D<sub>3</sub> 区带的蛋白亚基（或肽链）与其他花生蛋白质相结合，使花生蛋白具有不同的四级结构。由于四级结构的不同，因此等电

点也就不一样了。至于 D<sub>3</sub> 亚基或肽链如何影响和控制花生蛋白的等电点以及这种影响和控制有何生理意义？还需要对 D<sub>3</sub> 亚基（或肽链）及其影响的蛋白质的组成结构、理化性质及生理功能等方面研究，方能得以阐明。

我们也曾经将花生蛋白乳状液，直接进行 PAGE 分析，但未能获得较为满意的结果。如果首先用等电聚焦进行分离后，再进行 PAGE 分析，则可得到较为满意的结果。

## 参考文献

- 1 Fanteine, Thomas D et al. Electrophoretic investigation of peanut proteins I: composition of several peanut protein fractions. Arch. Biochem. 1945, 8: 239~249.
- 2 Deohary J M et al.  $\alpha$ -Conaraohin. Nature, 1961, 90: 1125~1126.
- 3 Eirich F R et al. The air-driven ultracentrifuge. Nature. 1940, 146: 541~542.
- 4 Busha M Sheikh. Resolution of peanut seed proteins by high-performance liquid chromatography. J. Agr Food Chem, 1988, 36: 778~781.
- 5 Cater M et al. Aqueous extraction of qilseed. JAOCS, 1974, 56: 137~141.
- 6 Lusas E W. Food uses of peanut protein. JAOCS, 1979, 56: 425~430.
- 7 Subrahmanyam J et al. Integrated processing of peanut for the separation of major constituents. J Amer Oil Chem Soc. 1959, 36: 66.
- 8 袁玉荪等. 生物化学实验. 北京: 高等教育出版社, 1978. 48, 68.
- 9 吴少伯. 植物组织中的蛋白质及同工酶-聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳. 植物生理学通讯, 1979, (1): 30~33.
- 10 梅百根. 蛋白质的双向凝胶电泳. 植物生理学通讯, 1983, (5): 52~54.
- 11 韦一能, 陈元发等. 花生蛋白质主要组分的亚基组成及分子量的研究 (待发表).
- 12 Macheboeuf Michel A et al. Influence of pH and electrolytes on the solubility of peanut proteins. Compt Rend Soc, 1942, 136: 557~559.
- 13 Johnson P et al. The physicochemical examination of the conaraohin fraction of the groundnut globulins. Faraday Soc Discussion, 1953, 13: 98~109.

(责任编辑: 蒋汉明 邓大玉)