

# 蒜头果蛋白质性质的鉴定及其中性糖含量的测定

袁燕<sup>1</sup>, 戴晓畅<sup>2</sup>, 郭丽红<sup>1</sup>, 陈雪<sup>1</sup>

(1. 昆明学院生命科学与技术系, 云南昆明 650031; 2. 云南大学教育部自然资源药物化学重点实验室, 云南昆明 650091)

**摘要** [目的] 鉴定新的植物蛋白质蒜头果蛋白是否为糖蛋白。[方法] 采用高碘酸-希夫试剂法进行糖蛋白性质的鉴定, 并用苯酚-硫酸法测定蒜头果蛋白的中性糖含量。[结果] 蒜头果蛋白能被高碘酸-希夫试剂染成紫红色。[结论] 蒜头果蛋白为糖蛋白, 中性糖含量为 3.75%。

**关键词** 蒜头果蛋白; 糖蛋白; 中性糖含量

**中图分类号** Q51 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)31-15097-02

## Glycoprotein Property Identification and Neutral Sugar Content Determination of Malanin in *Malania oleifera*

YUAN Yan et al (Department of Life Science and Technology, Kunming University, Kunming, Yunnan 650031)

**Abstract** [Objective] The aim was to identify whether malanin, a novel plant protein, is a glycoprotein or not. [Method] The glycoprotein prosperities of malanin were identified by using periodic acid-Schiff (PAS) method. And the neutral sugar content of malanin in *M. oleifera* was determined by using phenol-sulfuric acid method. [Result] The non-glycoprotein markers did not stain by PAS reagent whereas malanin did. [Conclusion] Malanin is a kind of glycoprotein, and the content of neutral sugar in malanin was 3.75%.

**Key words** Malanin; Glycoprotein; Content of neutral sugar

蒜头果 (*Malania oleifera* Chun et S. Lee) 又名马兰后、咪民、猴子果、吱厚、山桐果等<sup>[1]</sup>, 为铁青树科 (Olacaceae) 蒜头果属常绿乔木, 是我国特有单种属稀有植物<sup>[2]</sup>、国家 2 级保护树种和广西重点保护野生植物<sup>[3]</sup>。蒜头果蛋白 (malanin) 分子量为 61 875 Da, 等电点为 5.5, 由 A、B 2 条肽链通过二硫键连接而成。它是通过粉碎、抽提、硫酸铵沉淀、疏水色谱层析等分离手段, 从蒜头果种仁中分离、纯化出的一种新的植物蛋白质。笔者采用高碘酸-Schiff (PAS) 试剂法对 malanin 进行糖蛋白质性质的鉴定, 并用苯酚-硫酸法测定 malanin 的中性糖含量。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料与试剂** 蒜头果蛋白由云南大学教育部自然资源药物化学重点实验室制备; 丙烯酰胺、N,N'-亚甲双丙烯酰胺为 Pharmacia 产品; 考马斯亮蓝 G-250、SDS 为 Biom 产品; 其余试剂均为国产分析纯。

**1.2 主要仪器与设备** 蛋白质电泳系统 (Hoefer SE260, Amersham), UV-2401 紫外分光光度计 (日本岛津)。

## 1.3 方法

**1.3.1 糖蛋白质性质的鉴定。**

**1.3.1.1 SDS-PAGE 电泳。** SDS-PAGE 按 Laemmli<sup>[4]</sup> 方法进行, 分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 3%, 考马斯亮蓝 G-250 染色。

**1.3.1.2 糖蛋白质性质的检测。** 采用高碘酸-Schiff (PAS) 试剂法进行糖蛋白质性质的鉴定。SDS-PAGE 电泳完毕后, 用 50% 甲醇溶液固定 15 min, 2 次, 1% 高碘酸溶液氧化 10 min, 流水漂洗 5 min, 蒸馏水洗涤 2 次, Schiff 试剂染色 10 ~ 30 min, 流水漂洗后照相保存<sup>[5-6]</sup>。

**1.3.2 中性糖含量的测定。** 采用苯酚-硫酸法<sup>[7-9]</sup> 测定中性糖含量, 以葡萄糖作为标准。具体操作如下:

**1.3.2.1 标准葡萄糖溶液的配制。** 精密称取 105 °C 下干燥至恒重的葡萄糖对照品 10.0 mg, 置于 100 ml 容量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即为 0.1 mg/ml 葡萄糖标准溶液。

**1.3.2.2 苯酚溶液的配制。** 称取苯酚 100 g, 加铝片 0.1 g 和碳酸氢钠 0.05 g, 常压蒸馏, 收集 (180 ± 2) °C 馏分。

**1.3.2.3 标准曲线的制作。** 精密量取 0.1 mg/ml 葡萄糖标准溶液 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 ml, 加蒸馏水至 2.0 ml, 各加入苯酚 1.0 ml, 摇匀后迅速加入 5.0 ml 浓硫酸, 流水冲洗降温, 在波长 485 nm 处测定吸光度 (A)。以多糖含量 (μg) 为横坐标、吸光度 (A) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 并得到标准曲线方程。

**1.3.2.4 样品糖含量的测定。** 取浓度 472 μg/ml 的 malanin 溶液 2 ml, 按上述操作步骤测定吸光度, 以标准曲线计算糖含量。糖含量 (%) = (B × C/W) × 100。式中, B 为样品稀释后的体积; C 为由标准曲线得出的糖含量; W 为样品的重量。

## 2 结果与分析

**2.1 糖蛋白定性检测** 高碘酸-Schiff (PAS) 试剂染色法是对电泳凝胶中的糖蛋白定性检测的常用方法<sup>[10]</sup>。高碘酸 (periodic acid) 是一种强氧化剂, 能将多糖残基中的二醇基 (CHOH-CHOH) 氧化为二醛 (CHO-CHO), 二醛能与希夫试剂 (Schiff Reagent) 反应生成紫红色或粉红色不溶性复合物<sup>[11]</sup>。故 SDS-PAGE 胶染色后蛋白质条带若出现紫红色或粉红色, 则说明该蛋白质为糖蛋白; 若不显色, 则说明不是糖蛋白。

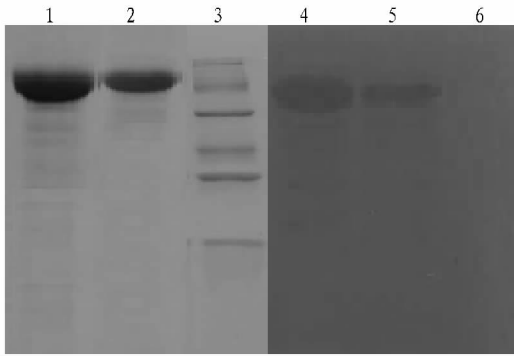
笔者同时做 2 块 SDS-PAGE 胶, 一块胶用考马斯亮蓝 G-250 染色, 另一块胶用高碘酸-Schiff 试剂染色。由图 1 可以看出, 用考马斯亮蓝 G-250 染色时, malanin 和蛋白质 Marker 均被染成了蓝色; 用高碘酸-Schiff 染色时, 只有 malanin 被染成紫红色, 而 Marker 却不被着色, 由此可初步推断 malanin 是一种糖蛋白。

**2.2 中性糖含量的测定** 硫酸-苯酚法自 1956 年由 Dubis M 等提出后, 经不断改良, 已成为常规的糖类分析方法。该方法不仅适合于单糖、寡糖、多糖的定性和定量分析, 而且可

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (30360025); 云南省应用基础研究面上项目 (2009CD154); 云南省教育厅项目 (2007Y40677); 昆明学院院级项目 (2009L018)。

**作者简介** 袁燕 (1975 - ), 女, 江西分宜人, 博士, 副教授, 从事植物蛋白质的分离纯化及生物活性研究。

**收稿日期** 2009-04-13



注:1,4.2 mg/ml 蒜头果蛋白;2,5.1 mg/ml 蒜头果蛋白;3,6. 蛋白质标准分子量(marker)。

Note:1 and 4,2 mg/ml malanin; 2 and 5,1 mg/ml malanin;3 and 6,Protein marker.

图1 考马斯亮蓝和希夫试剂染色的 SDS-PAGE 胶

Fig.1 SDS-PAGE gel stained with Coomassie brilliant blue and periodic acid-Schiff reagent

用于各种糖复合物如糖蛋白、糖肽和糖脂中总糖的定性和定量分析<sup>[12]</sup>。

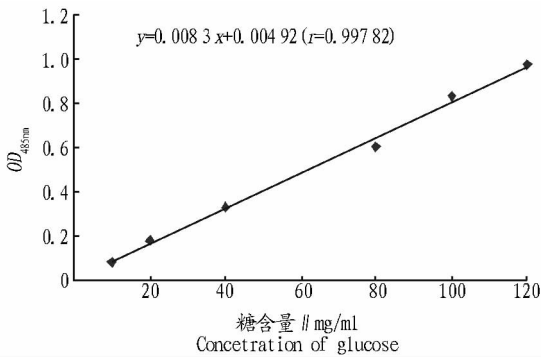


图2 葡萄糖标准曲线

Fig.2 Standard curve of glucose

笔者以糖含量( $\mu\text{g}$ )为横坐标、吸光度( $A$ )为纵坐标,绘制标准曲线如图2,并得回归方程: $y = 0.0083x + 0.00492$  ( $r = 0.99782$ ,  $SD = 0.02666$ ,  $n = 7$ ,  $P < 0.0001$ )。在波长485 nm处测定样品的吸光度( $A$ )值为0.152,根据回归方程计算出 malanin 的糖含量为3.75%。

### 3 结论

Malanin 是首次从我国广西、云南稀有、濒危植物——蒜头果种子中分离纯化出的一种新的植物蛋白质。高碘酸-Schiff(PAS)染色法表明,malanin 是一种糖蛋白;苯酚-硫酸法测定结果表明,该蛋白的中性糖含量为3.75%。

### 参考文献

- [1] 丘华兴,林有润.中国植物志(第24卷)[M].北京:科学出版社,1988.
- [2] 傅立国.中国植物红皮书——稀有濒危植物(第1册)[M].北京:科学出版社,1992:480.
- [3] 广西林业局保护站.广西壮族自治区重点保护野生植物资源调查报告[R].南宁,2001:6.
- [4] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature,1970,227:680-685.
- [5] KAPITANY R A,ZEBROWSKY E J. A high resolution PAS stain for polyacrylamide gel electrophoresis[J]. Anal Biochem,1973,56:361-369.
- [6] 刘翠芳,蒋继志.高碘酸-硝酸银染色法鉴定糖蛋白[J].生物技术通报,2006(S1):534-535.
- [7] 达胡白乙拉,乌仁,任晓娟,等.荞麦花多糖的提取及含量测定[J].光谱实验室,2007,24(2):116-118.
- [8] 季宇彬,郭守东,汲晨峰.野西瓜成熟果实中多糖的含量测定及毛细管电泳分析[J].中国药理学杂志,2006,41(15):1186-1189.
- [9] 云学英,罗素琴,吴宁远,等.珍珠花及茎中多糖含量测定及成分分析[J].内蒙古医学学报,2006,28(5):422-424.
- [10] 李亚娜,林永成,余志刚.甘薯糖蛋白的分离纯化和结构分析[J].华南理工大学学报,2004,32(9):59-62.
- [11] 汪显阳,姚春艳,张佩文.六味地黄丸中多糖含量测定研究[J].中医药研究,2000,16(4):42-44.
- [12] 杨晓华,于广利,赵峡,等.灰树花糖蛋白中总糖含量的测定[J].中国海洋大学学报,2006,36(6):929-931.
- [13] XIE HB,GONG Y,PENG T. Cloning of the promoter regions of golgi membrane glycoprotein GP73[J]. Agricultural Science & Technology, 2008,9(3):39-42,136.

(上接第15094页)

### 3 结论

从产物生成、催化剂活性和原料利用3个方面评价不同发酵起始pH值对沼气产生的影响,发现在发酵液初始pH值为7.0时,稻草秸秆发酵产沼气的量最高,发酵料液TS、VS降低程度最大(29.2%、24.6%)。产气过程中辅酶量的变化情况与发酵液中pH值变化关联不大,但在发酵液初始pH值为7.0时,产气过程中辅酶含量仍大于其他初始pH值产气过程中的辅酶量。结果表明控制发酵体系的pH值(7.0~7.2),使产甲烷菌处于最佳生存状态,是提高水稻秸秆发酵产沼气的关键。

### 参考文献

- [1] DUARTE A,ANDERSON G. Inhibition modeling in anaerobic digestion[J]. Water Science and Technology,1982,14:749-763.
- [2] BAILY J E,OLLIS D F. Biochemical engineering fundamentals[M]. 2 ed. New York:McGraw-Hill,1986.

- [3] GOTTSCHALK G. Bacterial metabolism[M]. 2 ed. New York:Springer-Verlag,1986.
- [4] FLORENCIO L,NOZHEVNIKOVA A,LANGERAK A, et al. Acidophilic degradation of methanol by a methanogenic enrichment culture[J]. FEMS Microbiology Letters,1993,109(1):1-6.
- [5] 赵洪,邓功成,高礼安,等. pH值对沼气产气量的影响[J]. 安徽农业科学,2008,36(19):8216-8217,8330.
- [6] 赵明星,严群,阮文权,等. pH调控对厨余物厌氧发酵产沼气的影 响[J]. 生物加工过程,2008,6(4):45-49.
- [7] 尹小波,柯益华. 产甲烷过程的独特酶类及生化监测方法[J]. 中国沼气,1998,16(3):8-12.
- [8] 杨立,张婷,王永泽,等. 不同秸秆厌氧发酵产沼气效果的比较[J]. 可再生能源,2008,26(5):46-48,52.
- [9] 赵阳,李秀芬,堵国成,等. 钴的配合物对甲烷发酵和产甲烷过程中关键酶的影响[J]. 食品与生物技术学报,2007,26(5):71-74.
- [10] FANG H H P,LIU H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture[J]. Bioresource Technology,2002,82(1):87-93.
- [11] KIM M,GOMEZ C,AHN Y, et al. Hydrolysis and acidogenesis of particulate organic material in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion[J]. Environmental Technology,2003,24(9):1183-1190.