

罗蕊,赵志强,黄凤兰,等.蓖麻毒蛋白在蓖麻组培苗不同部位叶片中含量的测定[J].江苏农业科学,2014,42(2):43-46.

# 蓖麻毒蛋白在蓖麻组培苗不同部位叶片中含量的测定

罗蕊<sup>1</sup>,赵志强<sup>1</sup>,黄凤兰<sup>2,3</sup>,陈永胜<sup>2,3</sup>,雷雪<sup>2</sup>,尚雨丝<sup>1</sup>,王超<sup>1</sup>,邱靖<sup>1</sup>,王婕<sup>2</sup>,郭书龙<sup>2</sup>

(1. 内蒙古民族大学农学院,内蒙古通辽 028000; 2. 内蒙古民族大学生命科学院,内蒙古通辽 028000;

3. 内蒙古自治区高校蓖麻产业工程技术研究中心,内蒙古通辽 028000)

**摘要:**本研究优化了从蓖麻叶片中提取蛋白的过程,利用硫酸盐沉淀法、BCA 试剂盒、UVwin5 紫外软件 V5.1.0、BandScan 蛋白定量分析软件相结合的方法对蓖麻组培苗不同部位叶片中的毒蛋白的含量进行测定,结果表明,蓖麻叶片中毒蛋白的含量与叶位呈正比。

**关键词:**蓖麻;蓖麻毒蛋白;含量;叶位;硫酸盐沉淀法

**中图分类号:** S565.601 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)02-0043-03

蓖麻(*Ricinus communis* L.),大戟科,世界十大油料作物之一<sup>[1]</sup>,具有很高的应用价值<sup>[2-5]</sup>。蓖麻中有毒的物质主要包括蓖麻碱、蓖麻毒蛋白、变应原、血球凝集素这 4 种物质,都具有很大的毒性。蓖麻毒蛋白是一种蛋白分解酶,是由毒类毒素、全毒素、凝集素这 3 种物质组成的蛋白质<sup>[6]</sup>,其相对分子量为 64 000 左右,也有报道为 36 000~85 000。蓖麻毒素(ricin)为白色粉末状或结晶状,无味,不溶于有机溶剂,在饱和的硫酸铵溶液中能沉淀析出。蓖麻毒蛋白由 A、B 2 条链组成。A 链是效应链,是一种具有 N-糖苷酶活性的多肽;B 链有凝集素的活性,能与细胞上的半乳糖的糖蛋白结合<sup>[7]</sup>。蓖麻提取物具有杀虫的特性,适用于开发生物农药。曾有人对蓖麻不同部位蓖麻碱的含量进行测定<sup>[8]</sup>,但至今国内还没有人测定过蓖麻不同时期叶片中毒蛋白的含量。本试验采用硫酸铵沉淀法、BCA 蛋白试剂盒法、UVwin5 紫外软件 v5.1.0、BandScan 蛋白定量分析软件相结合的方法,对蓖麻毒蛋白在蓖麻不同部位叶片中含量进行简单、快速、精确的分析测定,为研究蓖麻毒蛋白在植株各部位的含量分析奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

植物材料为通蓖 5 号蓖麻组织培养苗,由内蒙古民族大学蓖麻工程研究中心提供。

### 1.2 仪器与试剂

Hema 冷冻离心机(珠海黑马医学仪器有限公司);DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂);紫外可见分光光度计-T6 新世纪(北京普析通用仪器有限责任公司);BCA 蛋白定量试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司);

BandScan 蛋白定量分析软件。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 蓖麻粗蛋白的提取** 参照曾佑炜等的方法<sup>[9]</sup>,对每 1 g 叶片中磷酸缓冲液的加入量和 PEG 的分子质量进行优化,同时对比冷藏叶片和新鲜叶片的提取效果,从而确定试验方法。取 3 株蓖麻组织培养苗,称取约 1 g 蓖麻不同部位的叶片,在液氮中充分研磨;按照 1 g 叶片加入 10 mL 5 mmol/L 磷酸缓冲液(PBS,pH 值 6.5,含 100 mmol/L NaCl,称为缓冲液 A)的比例加入,并充分混匀;4 ℃ 放置过夜;4 ℃ 下 17 000 r/min 离心 30 min,小心去除沉淀和白色脂肪;重复离心 1 次,取上清;在上清中加入固体(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,达到 60% 饱和度;4 ℃ 放置 3 h;4 ℃ 下 17 000 r/min 离心 30 min;倒去上清,把沉淀溶解在缓冲液 A 中;装入透析袋(截留分子量:8 000~14 000),用 PEG(分子量 20 000)包埋后 4 ℃ 透析 3 h;4 ℃ 下 17 000 r/min 离心 30 min,取上清即为毒蛋白粗品,记录所得的粗蛋白的体积,并设置 3 个重复。

### 1.3.2 蓖麻粗蛋白含量的测定

**1.3.2.1 蛋白质标准曲线的制作** 标准曲线制作的操作步骤参照北京庄盟国际生物基因科技有限公司 BCA 蛋白定量试剂盒说明,得到浓度计算公式: $C = k_1 \times D_{562\text{ nm}} + k_0$ ,其中: $k_0 = -0.080\ 91$ , $k_1 = 0.982\ 79$ , $D_{562\text{ nm}}$ 为波长为 562 nm 处吸光度,相关性为 0.999 7。

**1.3.2.2 粗蛋白浓度测定** 取一定量粗蛋白,稀释 100 倍后测  $D_{562\text{ nm}}$ ,并根据蛋白标准曲线公式计算稀释 100 倍后粗蛋白的浓度  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。粗蛋白浓度  $C(\mu\text{g}/\mu\text{L}) = (k_1 \times \text{稀释 100 倍后的 } D_{562\text{ nm}} + k_0) \times 100$ 。

**1.3.2.3 粗蛋白含量的计算** 根据粗蛋白的浓度、粗蛋白的体积和每个样品中提取粗蛋白时叶片的重量,计算出每 1 g 叶片粗蛋白的含量。粗蛋白含量(mg) = 稀释 100 倍后浓度  $(\mu\text{g}/\mu\text{L}) \times \text{粗蛋白体积}(\text{mL})$ 。1 g 叶片粗蛋白含量(mg/g) = 叶片中粗蛋白含量(mg)/叶片重量(g)。

### 1.3.3 蓖麻毒蛋白含量的测定

**1.3.3.1 粗蛋白的 SDS-PAGE 电泳** 用 12% 的胶进行 SDS-PAGE 电泳,每个点样孔上样量为 30  $\mu\text{L}$ 。

**1.3.3.2 蛋白条带灰度比重分析** 具体操作步骤参见 BandScan 软件操作说明。得到每个品种中每种蛋白质占粗

收稿日期:2013-05-30

基金项目:国家自然科学基金(编号:30760123,31060194);国家民族事务委员会项目(编号:10NM02);内蒙古自然科学基金(编号:2010BS0511);内蒙古人才基金。

作者简介:罗蕊(1988—),女,内蒙古扎兰屯人,硕士研究生,主要从事植物基因工程研究。E-mail:luorui19880629@163.com。

通信作者:陈永胜,博士,教授,主要从事植物基因工程研究工作。E-mail:chenys-2012@hotmail.com。

蛋白的灰度百分比。

1.3.3.3 毒蛋白含量计算 根据 BandScan 软件分析毒蛋白占粗蛋白灰度百分比和每 1 g 叶片中粗蛋白含量,计算每 1 g 叶子中毒蛋白的含量。每 1 g 叶子中毒蛋白的含量(mg/g) = 每 1 g 叶片粗蛋白含量(mg/g) × 毒蛋白占粗蛋白的灰度百分比。

2 结果与分析

2.1 蛋白标准曲线的制作

利用 BCA 法绘制的蛋白质标准曲线见图 1。从图 1 可以看出,所制作的蛋白质标准曲线质量较好。

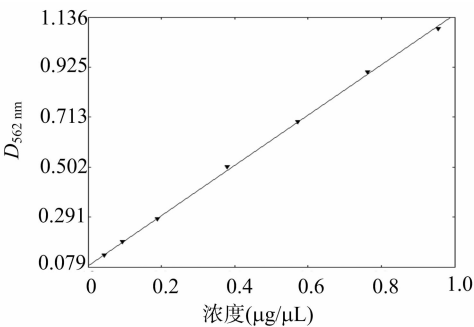


图1 蛋白质标准曲线

2.2 蓖麻粗蛋白含量的测定

对 3 株蓖麻粗蛋白含量的测定结果见表 1。  
从表 1 可以看出:第 1 株蓖麻不同部位叶片中粗蛋白含量从真叶 8 到真叶 14 依次为 6.177、3.717、6.266、4.190、7.149、12.399、5.673 mg/g;第 2 株蓖麻不同部位叶片中粗蛋

白含量从真叶 11 到真叶 19 依次为 11.883、9.073、10.790、15.919、9.471、6.541、10.806、6.278、16.889 mg/g;第 3 株蓖麻不同部位叶片中粗蛋白含量从真叶 13 到真叶 18 依次为 26.186、21.457、27.578、28.437、31.029、24.151 mg/g。

表 1 3 株蓖麻不同部位叶片中毒蛋白含量

植株	叶位	叶片用量(g)	粗蛋白体积(mL)	稀释 100 后测 $D_{562\text{ nm}}$ ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	粗蛋白浓度( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	粗蛋白含量(mg)	叶片中粗蛋白含量(mg/g)	毒蛋白占粗蛋白的百分比(%)	叶片毒蛋白含量(mg/g)
第 1 株	8	1.0143	1.580	0.122 67	3.965	6.265	6.177	2.3	0.142 07
	9	1.0420	0.753	0.134 67	5.144	3.873	3.717	1.6	0.059 47
	10	1.0354	2.000	0.115 33	3.244	6.488	6.266	0	0
	11	1.0943	1.085	0.125 33	4.226	4.585	4.190	0.8	0.033 52
	12	0.5706	1.368	0.112 67	2.982	4.079	7.149	0	0
	13	1.0852	2.153	0.136 33	5.307	11.426	12.399	0.5	0.062 00
	14	1.0394	0.800	0.157 33	7.371	5.897	5.673	0.6	0.034 04
第 2 株	11	1.0060	1.276	0.178 33	9.444	11.954	11.883	2.7	0.320 84
	12	0.8432	1.546	0.132 67	4.948	7.650	9.073	3.5	0.317 56
	13	0.6978	1.618	0.129 67	4.653	7.529	10.790	1.4	0.151 00
	14	1.0127	1.265	0.212 00	12.744	16.121	15.919	2.8	0.445 73
	15	0.8164	1.000	0.161 00	7.732	7.732	9.471	2.4	0.227 30
	16	1.0018	1.000	0.149 00	6.553	6.553	6.541	2.7	0.176 61
	17	0.9906	1.200	0.181 33	08.920	10.704	10.806	4.0	0.432 24
	18	1.0154	0.690	0.176 33	09.239	6.375	6.278	2.0	0.125 56
	19	1.0163	1.300	0.216 67	13.203	17.164	16.889	1.3	0.219 56
第 3 株	13	1.0106	1.400	0.274 67	18.903	26.464	26.186	2.0	0.523 72
	14	1.0465	1.190	0.274 33	18.870	22.455	21.457	2.4	0.514 97
	15	1.0087	1.530	0.267 33	18.182	27.818	27.578	3.3	0.910 07
	16	1.1000	1.550	0.287 67	20.181	31.281	28.437	3.3	0.938 42
	17	1.0299	1.320	0.328 67	24.210	31.957	31.029	4.0	1.241 16
	18	1.0481	1.190	0.298 67	21.262	25.302	24.151	2.6	0.627 93

2.3 粗蛋白的 SDS - PAGE 电泳

3 株蓖麻不同部位叶片粗蛋白电泳结果见图 2。从图 2 可以看出,毒蛋白分子量为 32.0 ku 和 34.0 ku 的 2 条带相距非常近,在电泳图中 2 条带有重叠的部分。

2.4 毒蛋白占粗蛋白的灰度百分比分析

BandScan 蛋白定量分析软件对 3 个植株不同部位叶片粗蛋白 SDS - PAGE 电泳结果进行分析,得出各种蛋白占粗蛋白的灰度百分比,由于每个叶片的条带数不同,所以毒蛋白在分析时不在一条直线上。另外毒蛋白的 2 条带分子量差异较小,电泳过程中有些出现 2 条带重叠现象,导致软件分析时,被认为是 1 条带,但不影响软件的最后分析结果。

对 3 株蓖麻的蛋白灰度分析见图 3 和表 1。

由表 1 和图 3 可以看出:第 1 株蓖麻不同部位叶片中毒

蛋白占粗蛋白的灰度的百分比从真叶 8 到真叶 14 依次为 2.3%、1.6%、0、0.8%、0、0.5%、0.6%;第 2 株蓖麻不同部位叶片中毒蛋白占粗蛋白的灰度的百分比从真叶 11 到真叶 19 依次为 2.7%、3.5%、1.4%、2.8%、2.4%、2.7%、4.0%、2.0%、1.3%;第 3 株蓖麻不同部位叶片中毒蛋白占粗蛋白的灰度的百分比从真叶 13 到真叶 18 依次为 2.0%、2.4%、3.3%、3.3%、4.0%、2.6%。

2.5 毒蛋白含量计算

对 3 株蓖麻中毒蛋白的含量计算结果见表 1。

由表 1 可以看出,第 1 株蓖麻不同部位叶片中毒蛋白含量从真叶 8 到真叶 14 依次为 0.142 07、0.059 47、0、0.033 52、0、0.620 0、0.034 04 mg/g;第 2 株蓖麻不同部位叶片中毒蛋白含量从真叶 11 到真叶 19 依次为 0.320 84、0.317 56、

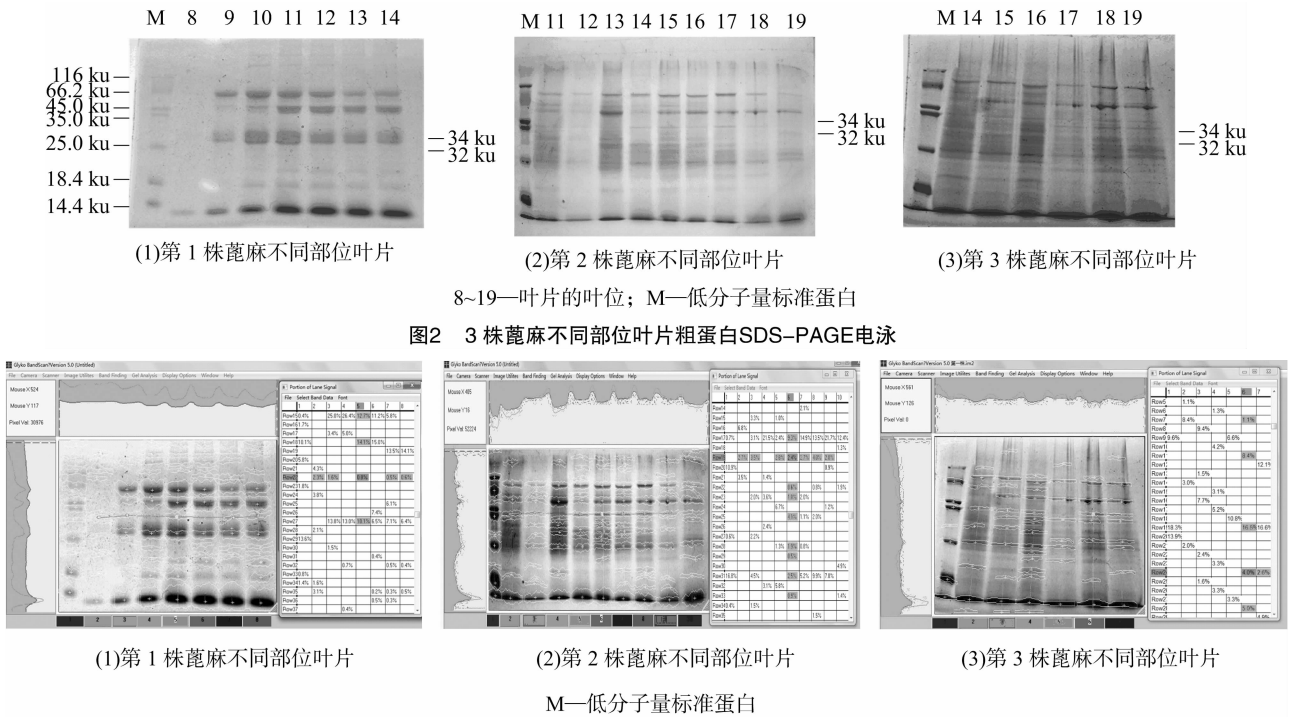


图2 3 株蓖麻不同部位叶片粗蛋白SDS-PAGE电泳

图3 3 株蓖麻不同部位叶片中毒蛋白含量灰度分析

0.151 00、0.445 73、0.227 30、0.176 61、0.432 24、0.125 56、0.219 56 mg/g;第3 株蓖麻不同部位叶片中毒蛋白含量从真叶13 到真叶18 依次为 0.523 72、0.514 97、0.910 07、0.938 42、1.241 16、0.627 93 mg/g。

根据表1 求出每个叶片中含有毒蛋白的平均含量,结果见表2。

表2 不同部位蓖麻叶片中毒蛋白含量的平均值

叶位	毒蛋白含量(mg/g)
8	0.142 07
9	0.059 47
10	0
11	0.177 18
12	0.317 56
13	0.245 57
14	0.331 58
15	0.568 69
16	0.557 52
17	0.836 7
18	0.376 75
19	0.219 56

根据表2 作不同部位蓖麻叶片中毒蛋白含量的散点图(图4),看线性趋势。

由图4 可以看出,不同部位蓖麻叶片中的毒蛋白的含量随着叶位的增大而增加。

3 结论与讨论

从总体上看,蓖麻叶片中的毒蛋白的含量与叶位呈正比。蓖麻提取物中的主要杀虫物质为蓖麻毒蛋白和蓖麻碱,蓖麻毒蛋白主要具有触杀作用,蓖麻碱则主要具有触杀胃

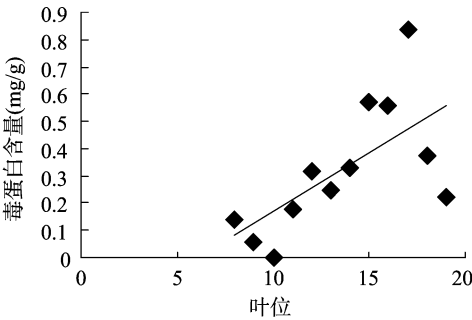


图4 不同部位蓖麻叶片中毒蛋白含量

毒和一定的拒食作用<sup>[10]</sup>。蓖麻毒蛋白用于制造生物农药具有很好的前景。在条件优化过程中发现,经冷冻的叶片中毒蛋白的含量低于新鲜叶片中毒蛋白的含量,叶片在冷冻过程中毒蛋白会降解;老叶片中毒蛋白的含量低于幼嫩的叶片中毒蛋白的含量,随着叶片中粗纤维的增加,蛋白质总量减少,同时毒蛋白的含量也减少。

蓖麻籽主要用于榨油,经高温处理后,蓖麻中的主要毒性物质只有变性原和蓖麻碱,饼粕可用于提取蓖麻碱。蓖麻的叶片主要用于秸秆还田,利用蓖麻叶片提取蓖麻毒蛋白有利于对蓖麻的充分利用,减少资源浪费,有助于开发新型生物农药,本研究为蓖麻毒蛋白在整株蓖麻叶片的分布奠定了基础,有利于农药开发的后续研究。

参考文献:

[1] 张宝贤,谭德云,刘红光,等. 我国蓖麻产业发展及其能源化利用的探讨[J]. 农业科技通讯,2010(1):22-23.  
[2] 潘国才,丁爱华. 蓖麻的综合利用现状[J]. 农业科技与装备,2009(1):1-2,5.

杨冉,黄萍,祁珊珊,等. 柳枝稷种子组培快繁技术[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):46-48.

# 柳枝稷种子组培快繁技术

杨冉<sup>1</sup>,黄萍<sup>1,2</sup>,祁珊珊<sup>1</sup>,杨淞惠<sup>1</sup>,杜道林<sup>1</sup>

(1. 江苏大学环境与安全工程学院,江苏镇江 212013; 2. 江苏大学农业工程研究院,江苏镇江 212013)

**摘要:**柳枝稷(*Panicum virgatum* L.)是一种理想的能源作物。以柳枝稷成熟种子为外植体,探索愈伤诱导过程中最佳外源激素配比,从而建立柳枝稷种子组培快繁体系。结果表明,不同浓度配比的激素愈伤诱导率差异较大,以 MS 培养基为基本培养基,添加 6 mg/L 2,4-D、1 mg/L 6-BA、0.6 mg/L NAA 进行诱导,愈伤诱导率可高达 82%。

**关键词:**柳枝稷;愈伤诱导;植株再生

**中图分类号:**S943.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)02-0046-03

柳枝稷(*Panicum virgatum* L.)为多年生草本 C<sub>4</sub> 植物,在北美洲广泛种植<sup>[1]</sup>。柳枝稷植株高大,具有根系发达、防风固沙能力强、耐瘠薄等优点,是沙漠绿化的理想植物<sup>[2]</sup>。柳枝稷可合成燃料乙醇、甲醇、沼气和氢气等,由于其能源产出率高,在乙醇生产过程中易降解,被美国政府确定为替代玉米生产燃料乙醇的首选能源植物<sup>[3]</sup>。保存并快速繁殖优质材料是现代生物育种技术的重要研究内容。Xi 等研究发现,柳枝稷是一种异型杂交的多倍体单子叶植物,具有高度的自交不亲和性<sup>[4]</sup>。因此,通过遗传转化获得具有高遗传力的柳枝稷转基因品种变得尤为重要,转基因育种的前提是建立高效的植物组织培养体系。现有的柳枝稷组培研究中,外植体多为叶片、茎尖、节间及幼穗,以这些材料作为外植体,愈伤诱导率普遍较低,且容易受生长周期及季节限制。本研究以柳枝稷成熟种子为材料,探索愈伤诱导过程中最佳外源激素配比,从而建立柳枝稷种子组培快繁体系,旨在为开发利用柳枝稷资源提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

收稿日期:2013-07-03

基金项目:国家自然科学基金(编号:31170386、31200316);江苏省科技支撑计划(编号:BE2011369、BE2012419);中国博士后科学基金(编号:2012M520999);江苏大学高级人才基金(编号:09JDG020、11JDG150)。

作者简介:杨冉(1988—),男,河南信阳人,硕士,主要从事能源植物新品种培育研究。E-mail:Ranyang0804@163.com。

通信作者:杜道林,博士,研究员,主要从事生态学研究。Tel:(0511)88790955;E-mail:ddl@ujs.edu.cn。

柳枝稷品种为 Alamo(北京市农林科学院),用自来水冲洗脱壳后的成熟种子,去掉杂质,用无菌水浸泡 12 h,冲洗后风干,置于 4 ℃冰箱中备用。

### 1.2 方法

**1.2.1 培养基配制** 愈伤组织诱导及分化以 MS 为基础培养基,采用 3 因素 3 水平进行试验(表 1),pH 值为 8.0。生根培养基为 1/2MS + NAA (0.4、0.8、1.2、1.6 mg/L) + 3% 蔗糖 + 0.75% 琼脂,pH 值为 8.0。配制完成后,121 ℃高压灭菌 15 min,待温度冷却至 50~60 ℃时摇匀,倒入培养皿中,置于超净台风干备用。

**1.2.2 种子处理** 挑选干燥饱满的种子,首先用 6% NaClO 溶液消毒 2.5 h,轻轻搅动使 NaClO 与种子充分接触,然后用无菌水清洗 3~5 遍,浸泡 12 h。之后用 6% NaClO 溶液消毒 20 min,用无菌水清洗种子 3~5 遍<sup>[5]</sup>。在无菌条件下,将处理好的种子接种到愈伤诱导培养基中进行培养。

**1.2.3 培养条件** 选择同一批成熟种子作为外植体进行愈伤组织诱导及分化试验,每处理重复 5 次,每个培养皿中接种 30 粒种子,置于光照培养箱中培养。培养 30~45 d 后,选择株高为 2~4 cm 的再生苗,切下幼苗转入生根培养基中,继续置于光照培养箱中培养,每个组培瓶接种 12 个外植体,每浓度重复 4 次,培养 10~15 d。愈伤组织诱导培养基试验因素及水平见表 1。GZX-300BS-4 光照培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司)培养温度设置为 24 ℃,光照培养时间为 16 h/d,光照强度为 12 000 lx。

**1.2.4 生长指标测定** 接种后,每 3 d 统计 1 次胚芽数目、胚根出现时间及数目、愈伤组织出现时间及数目等指标。培养 30~45 d 后,统计种子发芽率及愈伤诱导率,确定最佳愈伤组织诱导培养基激素配比。在诱导培养基上培养一段时间后观察愈伤组织的生长情况,观察并统计分化出的不定芽生

[3] 苏雅拉图. 蓖麻抗生育研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报:自然科学版,2011,26(3):316-319.

[4] 张红菊,赵怀勇. 蓖麻对盐渍土的改良效果研究[J]. 中国水土保持,2010(7):43-44,66.

[5] 张智勇,陈永胜,倪娜,等. 蓖麻产品在农药中的应用及研究进展[J]. 内蒙古农业科技,2011(6):74-76.

[6] 赵青余,桂荣,那日苏. 蓖麻饼脱毒的研究进展[J]. 饲料工业,2002,23(11):35-39.

[7] 孙媚华,陈迁,宋光泉,等. 蓖麻毒蛋白的研究与应用[J]. 广东化工,2009,36(9):144-145,162.

[8] 温燕梅,冯亚非,郑明珠. 蓖麻不同部位杀虫活性成分蓖麻碱的提取及含量[J]. 农药,2008,47(8):584-585,606.

[9] 曾佑炜,宋光泉,彭永宏,等. 蓖麻毒蛋白的分离纯化和毒理作用研究[J]. 中国农学通报,2004,20(4):23-25,32.

[10] 赵建兴,张树怀,余国珍,等. 蓖麻毒素粗提物杀虫作用的研究[J]. 内蒙古农业大学学报:自然科学版,2001,22(4):78-80.