

# Agilent 2100 生物分析仪通过测定蛋白表达进行转基因大豆种系的表征

## 应用

## 食品

### 作者

Debra Dempsey  
E.I. DuPont de Nemours  
DuPont Experimental Station  
Wilmington, DE 19880  
USA

Mark Jensen  
Agilent Technologies  
2850 Centerville Road  
Wilmington, DE 19808-1610  
USA

### 摘要

本应用指南旨在介绍如何使用 Agilent 2100 生物分析仪分析转基因种系中的蛋白提取物。该仪器在检测蛋白大小和浓度的准确度和精确度，能很好地满足实验大豆蛋白表达谱表征的要求。

### 前言

$\beta$ -球蛋白 (7S) 和大豆球蛋白 (11S) 是大豆中主要的种子贮藏蛋白，占总贮藏蛋白含量的 70%。这些蛋白质在大豆蛋白质中占有如此大的比例，因而具有非常可

观的经济价值。了解这些蛋白在不同大豆种子种属中的表达对于扩展食品中大豆蛋白的应用范围非常重要。研究表明，大豆中这两种蛋白的相对含量会显著影响大豆蛋白提取物相关食品的营养价值，味道和口感。因此，优先表达 11S 或 7S 蛋白的大豆种属一直是提高种子质量的研究中的热点。

球蛋白和大豆球蛋白是由更小的蛋白亚基组成的复杂的聚合物。 $\beta$ -球蛋白是一个由 53 kDa, 70 kDa 和 76 kDa 亚基组成的三聚体结构的 7S 蛋白。大豆球蛋白是由 6 个 40 kDa 和 20 kDa 蛋白组成的亚基构成的 11S 六聚蛋白。

蛋白亚基的大小已知时，可以直接用电泳分析这两种蛋白的含量水平。Agilent 2100 生物分析仪是自动化的微流控电泳平台，非常适合该范围蛋白质的分析。200 蛋白质芯片可分析 14-200 kDa 范围的蛋白。在不到 45 分钟的时间里，即可实现大豆蛋白样品的上样、分离，并分析相对蛋白质的组成。在本应用指南中，我们介绍了 Agilent 2100 生物分析仪在测定大豆 7S 和 11S 蛋白的表达水平中的应用。

## 实验部分

### 样品制备

将大豆研磨成粉，加 30 mg 样品于 Eppendorf® 管中，加 1000  $\mu$ L 提取缓冲液（含 50 mM Tris [pH 值 7.5]，10 mM 2-巯基乙醇，0.1% 的 SDS）。振摇 30 分钟后，15,000 g 离心 10 分钟。取上清后将蛋白上样到蛋白 200 芯片实验室，开始分析。

如果提取物含有过量的油脂，取上清后，在进行蛋白 200 分析之前需进一步稀释。

### 方法学

为了确定转基因大豆是否优先表达  $\beta$ -球蛋白或球蛋白类，我们将转基因大豆提取物和高表达 7S 或 11S 蛋白的野生型大豆进行了比较。按样品制备流程，制备了 20 个未知来源的大豆提取物样品。用 Agilent 2100 生物分析仪分离蛋白质进行蛋白表达谱测定。考虑到蛋白质的大小范围，采用蛋白 200 plus 芯片（14-200 kDa）进行分离。7S 和 11S 各个蛋白浓度通过与浓度内标（肌球蛋白）比较进行测定。后计算 7S/11S 蛋白质的比例，并将测得的比值与优先表达 7S 或 11S 类蛋白的天然大豆的比值进行比对。图 1 为对照、天然 7S、天然 11S 和未知转基因大豆代表性样品的电色谱图。相应的模拟凝胶电泳图为图 2 所示。

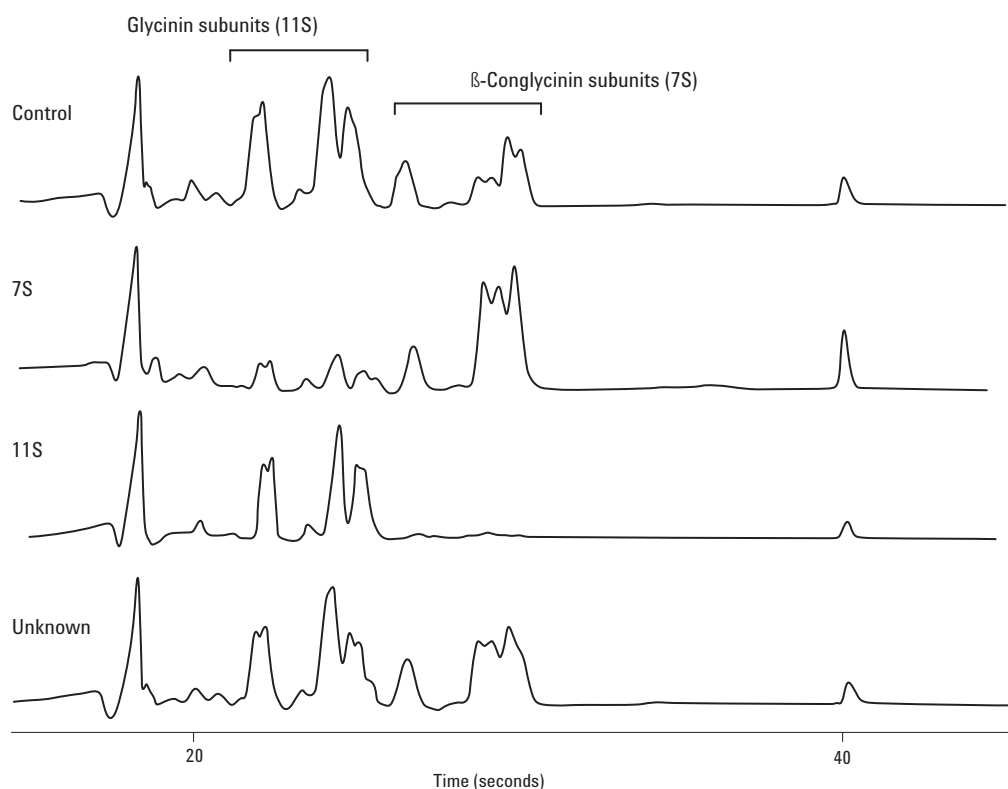


Figure 1. Electropherograms of soya protein extracts.

7s 和 11s 的比值是通过分别积分各个样本中的每个 7s 和 11s 蛋白组分，然后对每个样品中 7S 和 11S 蛋白组的总面积求比值而得到的。7S, 11S 和未知样的蛋白提取物水平以及 7S 和 11S 比值列于表 1。

测得的高表达 11S 和高表达 7S 大豆籽中 7S/11S 的比值范围应该介于 0.04 到 3.4 之间。对照样品和未知样品提取物的比值都在这个范围之内。所有 20 个未知样品的 7S 与 11S 的比值都大于对照样的比值。20 个未知样和 5 个对照样的平均比值分别为 0.72 和 0.39。两个样本集的测量精度非常好。

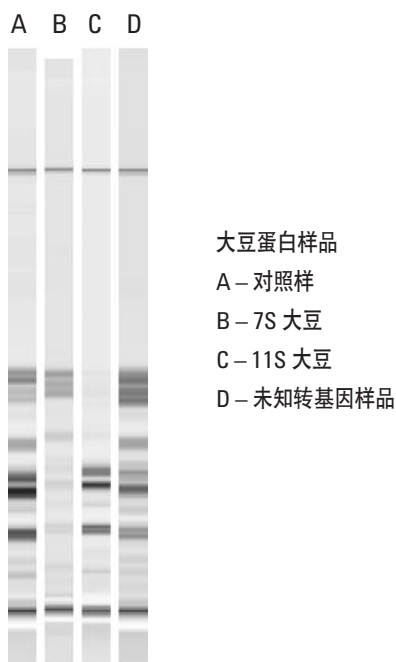


图 2. 的大豆蛋白提取物的模拟凝胶电泳图

表 1. 提取蛋白质水平和 7S/11S 比值蛋白比值

大豆	提取蛋白水平 $\mu\text{g/mL}$	7S/11S 比值
对照样	14,000	$0.39 \pm 0.004$ (n=5)
7S	5,200	3.4
11S	14,000	0.04
未知样	13,000	$0.72 \pm 0.1$ (n=20)

## 结论

本指南介绍了用 Agilent 2100 生物分析仪和蛋白 200 实验室芯片试剂盒进行未知样品中  $\beta$ -球蛋白和大豆球蛋白相对表达的测定。20 个未知样品中，7S/11S 的平均比值为  $0.72 \pm 0.1$ 。这个比例处于高 7S 表达大豆种属范围之内。在一定的比值测定的精度下，未知大豆种系属于高 7S 组具有统计学重要意义。通过与正常对照大豆种系的比较 (7S/11S 值为  $0.39 \pm 0.004$ )，进一步支持了上述结论。

Agilent 2100 生物分析仪与蛋白质 200 芯片实验室试剂盒是蛋白表达测定的快速、有效的工具。得到的蛋白质表达谱是进行新转基因产品鉴定的非常有效的手段。

## 参考文献

1. Kitamura, K., (1995) "Genetic Improvement of Nutritional and Food Processing Quality in Soybean," *Jpn. Agric. Res. Quart.*, **29**(1), 1-8.
2. Yaklich, R. W., (2001) "-Conglycinin and Glycinin in High-Protein Soybean Seeds," *J. Agric. Food Chem.* **49**, 729-735.

## 更多信息

欲了解更多有关我们产品和服务信息，请访问我们的网站 [www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)。

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

本资料中涉及的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司, 2003

2003 年 5 月中国印刷  
5988-9441CHCN