

油菜油体的提取方法优化及其稳定性探讨

李 宁,梁丛敏\*,臧 新\*\*,徐 静,杨冬之,田保明,张绵绵  
(郑州大学 生命科学学院,河南 郑州 450001)

**摘要:** 为了优化油体提取方法,获得较高纯度的油体,以甘蓝型油菜鼎油杂4号种子为试验材料,在漂浮离心、去污剂洗涤、离子洗脱液洗脱等程序的基础上,增加9 mol/L 尿素洗脱、正己烷萃取等步骤进行优化,并探讨了理化因素对油体稳定性的影响。结果表明:优化后的方法提高了离体油体的完整性,获得的油体纯度较高。随着NaCl浓度的增加,油体的稳定性下降;pH值≤3及pH值≥7时油体稳定分布,pH值为4~6时油体稳定性明显下降;温度对油体的影响较小,不同温度下油体分布相对稳定。在此基础上,利用SDS-PAGE对油体蛋白进行分离,获得了较清晰的蛋白质条带。

**关键词:** 甘蓝型油菜;油体;油体蛋白;提取;优化;稳定性

**中图分类号:** S565.4      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2015)04-0154-05

Optimization of Oil Body Extraction and Exploration of Oil Bodies' Stability in *Brassica napus*

LI Ning, LIANG Congmin\*, ZANG Xin\*\*, XU Jing, YANG Dongzhi, TIAN Baoming, ZHANG Mianmian  
(College of Life Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** In order to optimize the extraction method of oil bodies and obtain higher purity oil bodies, the seeds of *Brassica napus* L. (Dingyouza 4) was used as the experiment materials, on the basis of the original method of extracting oil bodies, such as flotation centrifugation, detergent washing and ion eluting, two-steps elution through 9 mol/L urea and extraction through n-hexane were increased to optimize the method. The effects of physical and chemical factors on the oil bodies' stability were explored. The results showed that: the stable and high purity of oil bodies were obtained by the optimization method. The stability of oil bodies decreased with the increase of NaCl concentration; the oil bodies stably distributed in pH≤3 and pH≥7 and the oil bodies' stability decreased obviously when pH value was between 4 and 6. The temperature almost had no effects on the oil bodies' stability, and the oil bodies were quite stable under different temperatures. On this basis, polyacrylamide gel electrophoresis were used to separate the oil body protein, and obtained a clearer protein band.

**Key words:** *Brassica napus* L.; oil bodies; oil body protein; extraction; optimization; stability

油体是植物储存油脂的一种亚细胞结构,存在于几乎所有积累油的植物组织中。在油料种子中,甘油三酯作为最初的能量储备,支持种子萌发和幼苗的前期生长<sup>[1-3]</sup>,在种子成熟过程中积累于子叶、胚乳/盾片等贮藏组织细胞的油体中<sup>[4]</sup>。Tzen等<sup>[5]</sup>提出的油体结构模型为:油体内部主要为三酰甘油

酯(TAG)的液态基质,外部则为磷脂单分子层及嵌入其内的油体结合蛋白组成的半单位膜,这个半单位膜的基本单位由13个磷脂分子和1个油体结合蛋白分子组成。油体膜及膜上附着的蛋白质参与油体结构的建成和生物学功能,并在油体的形成、稳定及油脂代谢利用过程中发挥关键作用<sup>[6]</sup>。提取油

收稿日期:2014-11-05

作者简介:李 宁(1989-),女,河南商丘人,在读硕士研究生,研究方向:植物细胞工程。E-mail:623596441@qq.com

\* 同为第一作者。

\*\* 通讯作者:臧 新(1968-),男,河南驻马店人,副教授,博士,主要从事植物细胞工程研究。E-mail:zangxin@zzu.edu.cn

体和分离油体蛋白有利于了解油体蛋白的组成、种类以及理化特性,为运用生物技术手段进一步改良品种、提高种子的油脂含量和改良油脂组分等打下基础<sup>[7]</sup>。

提取植物中油体的研究已有报道,在 Tzen 等<sup>[5]</sup>研究的基础上,刘玉君等<sup>[7]</sup>从小桐子种子中分离出油体并提取油体蛋白;熊丽东等<sup>[8]</sup>采用梯度离心、萃取抽提的方法得到红花油体蛋白;李玉琴<sup>[9]</sup>从甘蓝型油菜种子中提取了油体及油体蛋白。但油体提取过程中存在很多杂质的干扰,若油体提取不纯将严重影响油体蛋白的提取。研究发现,在许多植物油体蛋白的提取过程中出现有小分子蛋白,这些小分子蛋白是油体蛋白的真实组分还是污染物目前尚不清楚,因此,进一步优化油体纯度非常必要<sup>[10]</sup>。郑州大学生命科学学院植物细胞工程实验室前期做了此方面的一些研究,但结果并不十分理想,蛋白点有一定拖尾现象<sup>[9,11]</sup>,分析猜测可能是由于提取的油体纯度不够高,提取油体过程中受到外界环境影响所导致。赵路苹等<sup>[12]</sup>研究发现,提取油体过程中加入大于 6 mol/L 的尿素有利于去除油体表面结合的大豆蛋白质,得到高纯度的油体。据此,本研究对甘蓝型油菜种子油体提取方法进行了优化,并探讨了油体提取过程中外界环境对油体稳定性的影响,为后期提取纯度较高的油体蛋白打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

供试甘蓝型油菜鼎油杂 4 号种子,由湖北荆楚种业股份有限公司提供;主要试剂:磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、Tween-20、正己烷、尿素;主要仪器:NIKON-TE2000 倒置荧光显微镜、Avanti J-25 立式高速冷冻离心机、SK2200H 型超声仪、SDS 电泳系统等。

### 1.2 油体的提取

油体的提取参照 Tzen 等<sup>[5]</sup>的方法,根据赵路苹等<sup>[12]</sup>对大豆油体表面蛋白质去除效果的研究进行优化,并作一定的改动。称取大小适中、色泽一致的鼎油杂 4 号油菜种子 5 g 于纯净水中浸泡 5 h,用解剖针除去种皮,种胚置于 -20 ℃ 备用。将种胚放入预冷研钵中加入 20 mL 研磨液(含 0.6 mol/L 蔗糖、10 mmol/L pH 值 7.5 的磷酸钠缓冲液)4 ℃ 冰上研磨,将匀浆放入 50 mL 离心管中,收集上层油层,加入 20 mL 漂浮液 I(含 0.4 mol/L 蔗糖、10 mmol/L pH 值 7.5 的磷酸钠缓冲液),10 000 × g 4 ℃ 离心 30 min;收集上层油层,加入 20 mL 去污清洗液(含

0.1% Tween-20、0.2 mol/L 蔗糖、5 mmol/L pH 值 7.5 的磷酸钠缓冲液)于 50 mL 离心管中,收集上层油层加入 20 mL 10 mmol/L pH 值 7.5 的磷酸钠缓冲液,10 000 × g 4 ℃ 离心 30 min;收集上层油层于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 离子洗脱液(含 2 mol/L 氯化钠、0.6 mol/L 蔗糖、10 mmol/L pH 值 7.5 的磷酸钠缓冲液),收集上层油层,加入 20 mL 漂浮液 II(含 2 mol/L 氯化钠、0.25 mol/L 蔗糖、10 mmol/L pH 值 7.5 的磷酸钠缓冲液),10 000 × g 4 ℃ 离心 30 min;收集油层重悬于 20 mL 9 mol/L 的尿素,室温振荡 10 min,然后加入 20 mL 10 mmol/L pH 值 7.5 的磷酸钠缓冲液,10 000 × g 25 ℃ 离心 30 min;收集油层于 20 mL 研磨液并加入 20 mL 正己烷混匀,10 000 × g 25 ℃ 离心 30 min;收集油层重悬于 20 mL 研磨液,再加入 20 mL 漂浮液 I,10 000 × g 4 ℃ 离心 30 min;收集油层(即为油体)于 10 mL 离心管中备用。

### 1.3 离体油体观察

取少量油体进行压片后用 NIKON-TE2000 倒置荧光显微镜观察并拍照。

### 1.4 理化因素对油体稳定性的影响

pH 值、NaCl 浓度、温度对离体油体稳定性的影响测定参照 Iwanaga 等<sup>[13]</sup>的方法并作一定改动,具体步骤如下:

(1)取 2 g 油体加入到 20 mL 10 mmol/L pH 值 7.0 的 PBS 中混匀,配成 10% 的母液。

(2)分别取 1 mL(1)中所配母液加入 5 mL 10 mmol/L pH 值 7.0 的 PBS 缓冲液混匀,用 0.1 mol/L NaOH 和 0.1 mol/L HCl 分别调节混合液的 pH 值为 2、3、4、5、6、7、8,室温放置 24 h 后镜检拍照。

(3)分别取 1 mL(1)中所配母液加入 5 mL 10 mmol/L pH 值 7.0 的 PBS 缓冲液(分别含 0、10、25、50、100、250 mmol/L NaCl),室温放置 24 h 后镜检拍照。

(4)分别取 0.5 mL(1)中所配母液于 1.5 mL 离心管中,放置于 20、30、40、50、60、70、80、90 ℃ 纯水中水浴 30 min,冷却至室温后镜检拍照。

### 1.5 油体蛋白的提取

采用 Tzen 等<sup>[5]</sup>方法并作一定改动,将油体重悬于 3 mL 研磨液加入 15 mL 石油醚,涡旋振荡 5 min,13 000 × g 4 ℃ 离心 5 min,弃石油醚,重新加入 15 mL 石油醚,涡旋振荡 5 min,13 000 × g 4 ℃ 离心 5 min,此过程重复 5 次。弃石油醚和研磨液,室温挥发掉离心管内多余的石油醚,离心管中加入 3 mL

超纯水和 15 mL 氯仿/甲醇(2:1)溶液,涡旋振荡 5 min,13 000 × g 4 ℃ 离心 5 min,反复重复此步骤直至离心管中液体澄清透明,此时油分除尽。取中间层油体蛋白加入 2 mL 超纯水,超声 5 min 后加入 15 mL 丙酮,-20 ℃ 沉淀 16 h 以上。15 000 × g 4 ℃ 离心 20 min,除去多余丙酮,将蛋白粉末分装于 1.5 mL 离心管(每管 20 mg)-80 ℃ 保存备用。

1.6 油体蛋白的 SDS-PAGE 分析

1.6.1 蛋白干粉裂解 取未经优化提取与优化提取的油体蛋白干粉样品各 1 管(每管 20 mg),以 1:25 (m/V)的量加入裂解液(含 7 mol/L 尿素、2.0 mol/L 硫脲、4% 3-[(3-胆固醇氨基丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸(两性离子去垢剂)、2% pH 值 3~10 的两性电解质、2% DTT);涡旋振荡 10 min,室温下 8 000 × g 离心 5 min,再将样品振荡、离心,多次重复该步骤直至样品溶解;室温下 13 000 × g 离心 25 min 取上清备用。

1.6.2 蛋白质定量 油体蛋白浓度的测定参考 Bradford 方法<sup>[14]</sup>,通过标准曲线计算待测样品蛋白质浓度。

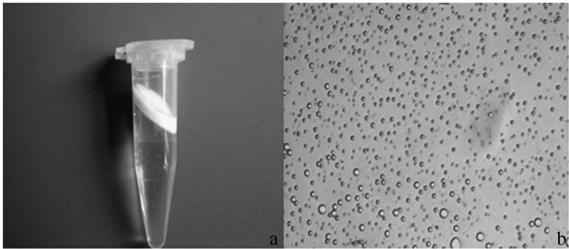
1.6.3 SDS-PAGE 取裂解好的蛋白质上清液及蛋白质 Marker 1 管(10 μL),100 ℃ 水浴变性 5 min 后冷却至室温,室温下 12 000 × g 离心 5 min 后加样,每孔加样 10 μg。

1.6.4 电泳环境及染色 电泳采用 15.0% 分离胶、5.0% 浓缩胶,稳压 50 V 1 h,100 V 2 h,电泳结束后去掉上层浓缩胶,将分离胶放入 300 mL 固定液(40.0% 甲醇、10.0% 冰醋酸)中摇床固定 40 min;弃固定液,将凝胶置于 300 mL 染色液(0.1% R-250、50.0% 甲醇、10.0% 冰醋酸)中摇床染色 40 min;换掉染色液,将凝胶放入 300 mL 脱色液(37.0% 甲醇、10.0% 冰醋酸)中脱色过夜,第 2 天更换一次脱色液,直至凝胶背景清晰即可进行扫胶。

2 结果与分析

2.1 油菜离体油体观察结果

本研究采用改进的油体提取方法从油菜种子中提取得到乳黄色的油体,从图 1a 可以看出,提取得到的油体颜色均一、杂质较少。挑取图 1a 中油体做压片得到离体油体显微图片(图 1b),从图 1b 可以看出,离体油体分布均匀、油体大小均一、杂质较少、密度大,与 Tzen 等<sup>[5]</sup>的研究结果一致,说明此方法获得的油体纯度较高且比较稳定,适合进行后续的油体蛋白提取。



a. 油体提取; b. 离体油体(400 ×)

图 1 离体油体形态观察

2.2 pH 值、离子浓度、温度对油菜油体稳定性的影响

2.2.1 pH 值 从图 2 可以看出,当溶液 pH 值为 2、3、7、8 时,试管内溶液呈乳白色,油体均匀悬浮,当溶液 pH 值为 4、5、6 时试管内溶液澄清,油体漂浮于试管上层,说明 pH 值对油体的稳定性有一定影响,pH 值 ≤ 3 及 pH 值 ≥ 7 时油体稳定分布,pH 值为 4~6 时,油体稳定性被破坏。

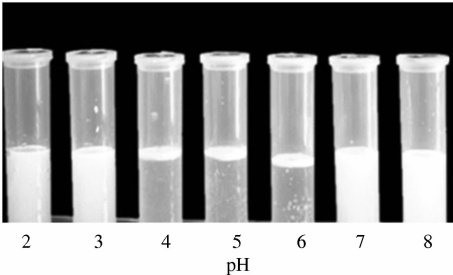


图 2 不同 pH 值条件下油菜油体的稳定性

采用 NIS-Elements BR 软件对不同 pH 值条件下的油体显微图片进行分析得到油体粒度分布图(图 3),从图 3 可以看出,在 pH 值为 2、3、7、8 时油体直径相当,平均为 2.29 μm;pH 值为 4~6 时油体直径明显偏高,最高值达到 5.5 μm,平均直径为 5.12 μm。此结果显示,pH 值为 4~6,油体直径明显增高,与图 2 中离体油体稳定性的结果一致。

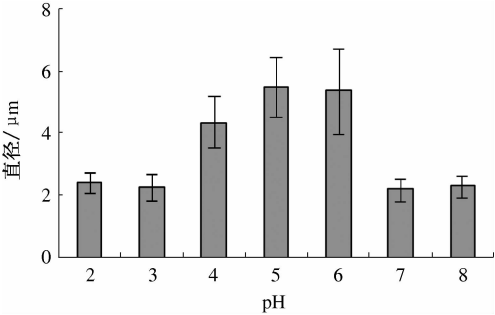


图 3 不同 pH 值条件下离体油体粒度分布

2.2.2 NaCl 浓度 从图 4 可以看出,NaCl 浓度为 0 mmol/L 时,试管内溶液呈乳白色,油体均匀悬浮;NaCl 浓度为 10 mmol/L 时油体状态变化不大;当 NaCl 浓度增加至 25 mmol/L 时,试管内油体变得澄

清,开始漂浮于试管上层;随着 NaCl 浓度的继续增加,油体变得越来越澄清,说明随着 NaCl 浓度的增加油体的稳定性呈下降趋势。

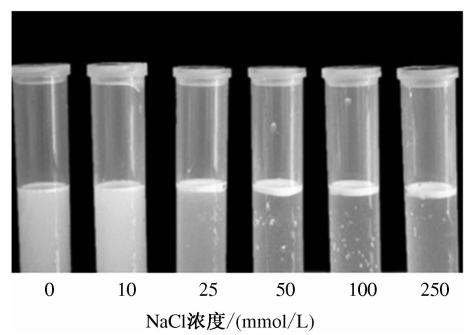


图 4 不同 NaCl 浓度下油菜油体的稳定性

采用 NIS - Elements BR 软件对不同 NaCl 浓度下油体显微图片进行分析得到油体粒度分布图(图 5),从图 5 可以看出,NaCl 浓度为 0 mmol/L 时油体直径为 2.19  $\mu\text{m}$ ,随着 NaCl 浓度增加,油体直径不断增加,NaCl 浓度为 250 mmol/L 时油体直径高达 5.62  $\mu\text{m}$ ,此结果与图 4 离体油体稳定性的结果一致。

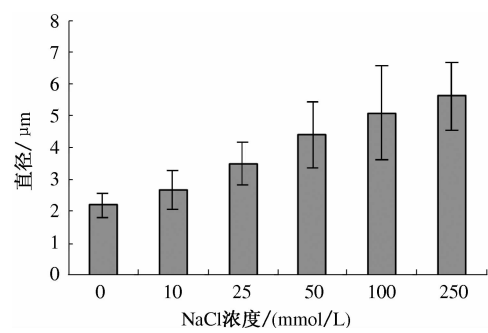


图 5 不同 NaCl 浓度下离体油体粒度分布

2.2.3 温度 采用 NIS - Elements BR 软件对不同温度下油体显微图片进行分析得到油体粒度分布图(图 6),图 6 显示,随着温度的升高,油体直径基本没有变化,平均直径为 2.33  $\mu\text{m}$ 。说明温度对油体的影响较小,不同温度下油体较稳定。

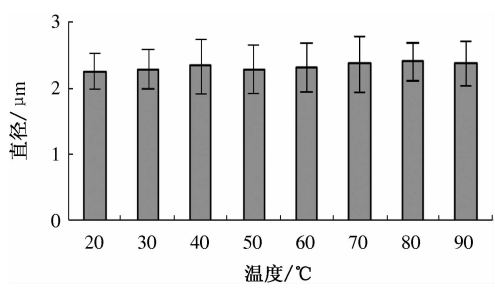
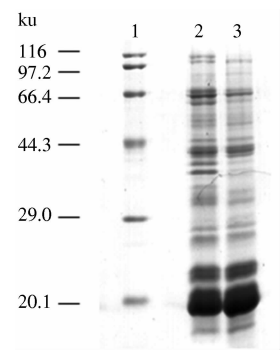


图 6 不同温度下离体油体粒度分布

2.3 油菜油体蛋白的 SDS - PAGE 分析结果

对提取的油体蛋白样品进行 SDS - PAGE 分析,结果显示:从未纯化油体中分离的油体蛋白条带丰富,与之相比,从纯化后油体分离得到的油体蛋白一些条带明显消失,尤其是一些大分子条带,说明油体纯化的步骤很关键,为后续试验排除了部分干扰。



1. Marker; 2. 提纯前的油体蛋白; 3. 提纯后的油体蛋白

图 7 油体蛋白的 SDS - PAGE 分析结果

3 结论与讨论

Tzen 等<sup>[5]</sup>提出的油体结构模型认为,油体位于外围的半单位膜由一层磷脂分子和油体蛋白镶嵌而成,每个磷脂分子的亲水头部基团位于油体外侧,与细胞液接触,而 2 个疏水酯基位于油体的内侧,与疏水的三酰甘油分子相互作用。油体特殊的结构保证了其非常稳定的特性,Frandsen 等<sup>[6]</sup>研究发现,无论是在干燥种子的细胞内还是在离体环境中,油体之间都不发生聚合,甚至经过一定时间的放置还能保持其稳定性。油体的稳定性主要是由表面的油体结合蛋白决定的,这些油体蛋白的等电点约为 5.7 ~ 6.6<sup>[14-16]</sup>。等电点与油体蛋白稳定性有很大关系,环境(如酸碱度、盐浓度、温度)的改变会破坏油体表面结构,导致油体稳定性下降<sup>[17]</sup>。

加入酸、碱后明显改变了油体表面带电状态,在油体等电点附近,油体表面的净电荷明显减小,导致油体之间的静电排斥作用明显降低,许多油体之间发生聚合使其直径变大。杨素铄等<sup>[18]</sup>研究发现,油体在 pH 值为 7.0 ~ 8.0 即处在中性或偏碱性环境时光密值高,说明油体以单独个体存在,并且是悬浮在缓冲液中,其稳定性最佳。本研究结果显示,pH 值为 4 ~ 6 时油体稳定性明显下降,油体直径明显增大,pH 值为 5 时油体直径达到最大值(5.5  $\mu\text{m}$ ),是 pH 值为 7 时油体直径的 228%,这可能预示甘蓝型油菜种子油体表面结合蛋白的等电点约为 4 ~ 6。

当加入不同浓度的盐(NaCl)时,随着 NaCl 浓度的增加,油体稳定性逐渐下降,本研究结果与杨素

铀等<sup>[18]</sup>的结论基本一致。这可能是由于随着 NaCl 浓度的增加,Na<sup>+</sup> 越来越多,油体表面的负电荷被中和,油体表面所带的电荷量减少,离体油体之间的静电斥力也越来越小,导致离体油体之间发生融合,油体直径增加<sup>[3]</sup>。

本研究结果表明,温度对油体稳定性的影响较小,不同温度下油体较稳定,这与康波<sup>[19]</sup>和吴娜娜等<sup>[20]</sup>关于大豆油体对热的稳定性论述一致。Tzen 等<sup>[5]</sup>根据其氨基酸残基极性的分布,推测油体蛋白伸入 TAG 基质中的疏水区域为反式平行的  $\beta$  折叠结构,其顶部具有由 3 个脯氨酸和 1 个丝氨酸组成的“脯氨酸结”,形成发卡结构。油体的这种特殊结构使得油体结合蛋白的头部在加热时也可以伸入到 TAG 内部而不外露,因此油体在加热时同样能够保持稳定状态。

油体提取过程受到很多因素干扰,本研究从 NaCl 浓度、pH 值、温度方面探讨了外界环境对油体稳定性的影响,为甘蓝型油菜油体蛋白的进一步解析打下了基础。在原有提取油体的基础上加入 9 mol/L 尿素洗脱以除去部分非特异性结合的蛋白质,然后用正己烷萃取以检测油体的完整性,得到的油体蛋白纯度也较高。但试验过程中发现,经过一系列反复抽提、萃取、浸提处理,最后得到的蛋白质含量较少且丰度较低,今后可进一步研究如何提高油体蛋白的含量及丰度。

#### 参考文献:

- [1] Huang A H C. Oil bodies and oleosins in seeds[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1992, 43: 177-200.
- [2] Wanner G, Formanek H, Theimer R R. The ontogeny of lipid bodies (sphaerosomes) in plant cells ultra structural evidence[J]. Planta, 1981, 151: 109-123.
- [3] Huang A H C. Oleosin and oil bodies in seeds and other organs[J]. Plant Physiol, 1996, 110: 1055-1061.
- [4] 丁勇,徐春雷,甘莉. 植物油体及其相关蛋白的研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2008, 27(4): 558-563.
- [5] Tzen J T C, Huang A H C. Surface structure and properties of plant seed oil bodies[J]. Cell Biology, 1992, 117(2): 327-335.
- [6] Frandsen G I, Mundy J, Tzen J T C. Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin [J]. Physiol Plant, 2001, 112(3): 301-307.

- [7] 刘玉君,沈世华. 小桐子种子油体蛋白的提取及其电泳分析[J]. 林业科学, 2008, 44(8): 37-41.
- [8] 熊丽东,杨晶,田海山,等. 红花油体及油体蛋白 Oleosin 的分离纯化[C]//泛环渤海地区(七省二市)生物化学与分子生物学学会——2010 年学术交流会论文集. 泰安:山东生物化学与分子生物学会, 2010.
- [9] 李玉琴. 不同含油量甘蓝型油菜种子全蛋白及油体蛋白的双向电泳分析[D]. 郑州:郑州大学, 2012.
- [10] Millichip M, Tatham A S, Jackson F, et al. Purification and characterization of oil-bodies (oleosomes) and oil-body boundary proteins (oleosins) from the developing cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.) [J]. Biochemical Journal, 1996, 314: 333-337.
- [11] 梁丛敏,李玉琴,杨冬之,等. 甘蓝型油菜种子油体蛋白提取及双向电泳分析[J]. 南方农业学报, 2013, 44(11): 1776-1780.
- [12] 赵路苹,陈业明,张彩猛,等. 提取条件对大豆油体表面蛋白质去除效果的研究[J]. 大豆科学, 2013, 36(6): 835-839.
- [13] Iwanaga D, Gray D A, Fisk I D, et al. Extraction and characterization of oil bodies from soy beans: A natural source of pre-emulsified soybean oil [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(21): 8711-8716.
- [14] Li H, Yang J, Chen Y, et al. Expression of a functional recombinant oleosin-human hyaluronidase hPH-20 fusion in *Arabidopsis thaliana* [J]. Protein Expression and Purification, 2014, 103: 23-27.
- [15] 程红焱,宋松泉. 种子的贮油细胞器——油体及其蛋白[J]. 植物学通报, 2006, 23(4): 418-430.
- [16] Nikiforidis C V, Kiosseoglou V. Aqueous extraction of oil bodies from maize germ (*Zea mays*) and characterization of the resulting natural oil-in-water emulsion [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57: 5591-5596.
- [17] Bao M T, Wang L N, Sun P Y, et al. Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment [J]. Marine Pollution Bulletin, 2012, 64(6): 1177-1185.
- [18] 杨素铀,王秀春,蕙玉琴,等. pH、无机盐离子对裸子植物种子中油体稳定性的影响[J]. 西北师范大学学报:自然科学版, 1996, 32(1): 57-59.
- [19] 康波. 花生油体乳液稳定性及乳液凝胶的研究[D]. 广州:华南理工大学, 2010.
- [20] 吴娜娜,杨晓泉,郑二丽,等. 大豆油体乳液稳定性和流变性分析[J]. 农业工程学报, 2012, 28(1): 369-374.