

利用蛋白质“指纹”技术鉴定啤酒大麦的品种和纯度

林 艳^{1,2}, 梅承芳², 董建军², 周志娟², 梁彦君², 解 彬², 祁明霞², 于世敏²

(1. 中国海洋大学生命科学与技术学部, 山东 青岛 266003;

2. 青岛啤酒股份有限公司科研中心, 山东 青岛 266061)

摘 要: 采用操作简便、分辨率高的种子醇溶蛋白 SDS-PAGE 电泳技术对常用澳大利亚和法国啤酒大麦进行鉴定, 利用 Gel-Pro 软件对电泳图谱进行条带分析和比较, 建立了澳大利亚和法国啤酒大麦品种的生化标准“指纹”图谱库。并对供试的啤麦品种进行遗传聚类分析, 结果与传统分类相近。

关键词: 啤酒; 蛋白质“指纹”技术; 啤酒大麦; SDS-PAGE 电泳; 品种和纯度鉴定

中图分类号: TS262.5; S512.31; TS261.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2005)10-0060-05

Breed and Purity Identification of Beer Barley by Protein Fingerprint Technique

LIN Yan^{1,2}, MEI Cheng-fang² and DONG Jian-jun² et al.

(1. Division of Life Science and Technology of Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003;

2. R&D Center of Tsingtao Brewery Co. Ltd., Qingdao, Shandong 266061, China)

Abstract: SDS-PAGE electrophoresis technique was used to identify the breed and purity of Australian and French beer barley. Furthermore, the electropherogram was analyzed by Gel-Pro software and the standard fingerprint bank of Australian and French beer barley seed was established. Besides, the heredity and clustering analysis of testing beer barley seed also presented similar results as traditional classification. (Tran. by YUE Yang)

Key words: beer, protein fingerprint technique; beer barley; SDS-PAGE electrophoresis; breed and purity identification

啤酒大麦是啤酒的主要原料。大麦品种不同, 麦芽及啤酒的品质也存在差别, 啤酒的酿造工艺也需要做出相应调整, 否则将严重影响啤酒质量、口味和胶体稳定性等。虽然已经建立了啤酒大麦的通用质量标准, 但很难客观反应不同品种的大麦品质, 只有在了解品种的前提下建立指标才更具有实际意义。因此, 如何准确鉴别大麦的品种和纯度是评判进口啤麦质量的重要指标。

目前大麦品种的鉴别主要采用种子醇溶蛋白电泳法。醇溶蛋白属于一类贮存蛋白, 存在于大麦的淀粉胚乳中。在成熟种子中, 占总蛋白含量的 40%~50%^[1]。醇溶蛋白具有特殊的溶解性质, 可由乙醇-水混合溶液进行提取^[2]。Draper 等通过大量试验, 认为大麦种子醇溶蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱可作为品种的生化“指纹”, 用于品种真实性和纯度的鉴定^[3]。国内石思信等也利用电泳技术进行过水稻品种鉴定的研究^[4]。但该法在我国并未得到推广应用, 且最为关键的是各主要啤酒大麦的标

准 SDS-PAGE 凝胶图谱库至今尚未建立, 导致该鉴定技术无法用于进口啤麦的品种和纯度鉴定。目前, 国内各商品检验部门与一些大麦采购企业对进口啤酒大麦进行品种鉴别主要是通过大麦糊粉层的颜色、基轴、麦芒及基痕等感官检验为主, 缺乏准确的生物化学方法。我公司作为国内加拿大啤酒大麦的主要进口企业, 尽快开发准确度更高的大麦品种的真实性和纯度检测方法和构建啤酒大麦标准蛋白质“指纹”谱库具有重要意义和价值。

本研究采用 SDS-PAGE 电泳方法对澳大利亚、法国啤酒大麦的主要品种进行了电泳, 并利用 Gel-Pro 软件对电泳的凝胶图谱进行条带分析, 利用 Cross Checker 2.8 和 MEGA 3 软件分别对澳麦和法麦品种进行遗传聚类分析, 通过大麦种子醇溶蛋白的电泳图谱建立了每个品种的生化“指纹”, 分别组成澳大利亚、法国啤酒大麦品种标准图谱库。进行了人工混种试验, 并鉴定了品

收稿日期: 2005-04-29

作者简介: 林艳 (1968-), 女, 辽宁人, 高级工程师, 硕士研究生, 曾获 2002 年国家科技进步二等奖。

种纯度,成功地应用于公司采购的进口啤酒大麦品种和纯度的检测控制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 大麦

建立澳大利亚和法国啤酒大麦品种标准图谱库时,选取目前常用的7个品种。澳大利亚啤酒大麦:Gairdner, Stirling 和 Sloop; 法国啤酒大麦: Prestige, Vanessa, Esterel 和 Scarlett。上述大麦种子标准样品分别由澳大利亚大麦局(ABB)和法国制麦和酿造学院提供。

1.1.2 试剂

丙稀酰胺、双丙稀酰胺、SDS、TEMED 等主要试剂为进口分装,其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器

Amersham miniVE 型电泳仪和北京六一仪器厂生产的DYCZ-30型电泳仪。

1.2 方法

1.2.1 大麦醇溶蛋白的提取

取一粒大麦种子,碾碎,放入1.5 mL的离心管中(建立标准库时每品种重复6管,进行品种纯度鉴定每品种重复100管)。每个离心管中分别加入0.5 mL醇提取液(0.5 g Tris, 50 mL 正丙醇, 5 g DTT, 蒸馏水定容至100 mL),混合均匀,80 °C水浴20 min。3000 r/min离心10 min,取上清液50 μL,加入50 μL提取液,混合均匀,80 °C水浴20 min。即得到大麦醇溶蛋白提取液。

1.2.2 凝胶的制备

建立大麦品种标准图谱库时,采用Amersham的miniVE型电泳仪,选取其中1 mm厚度胶模,10个齿的样品梳,每个品种进行一块板的SDS-PAGE不连续凝胶电泳(7道样品和1道蛋白标准品)。

进行大麦品种纯度鉴定时,考虑到样品量较大,采用了国产北京六一厂生产的DYCZ-30型电泳仪,它的凝胶板面积为105×185 mm,选取1 mm厚度胶模,52齿样品梳,非常适宜作样品量较大的种子纯度鉴定。每个大麦品种需进行两块板电泳(100道样品和1道蛋白标准品)。

浓缩胶浓度6%,分离胶浓度为12%。

1.2.3 电泳

提取的醇溶蛋白提取液,加入等体积样品处理液,煮沸3 min。每个样品槽加样15 μL。浓缩胶稳流20 mA,分离胶稳流30 mA进行电泳。

1.2.4 结果分析

电泳凝胶脱色扫描后,利用美国冷泉港公司的Gel-Pro 3.1分析软件对胶片进行谱带分析,可自动得到每

一条蛋白谱带的分子量。对不同大麦品种的图谱进行分析比较。

根据每一品种电泳得到的蛋白带数和分子量,利用Cross Checker 2.8和MEGA 3软件分别对供试的澳麦和法麦品种进行遗传聚类分析。

2 结果与讨论

2.1 大麦品种间醇溶蛋白电泳图谱的差异

2.1.1 澳大利亚啤麦图谱分析

图1为3个澳大利亚啤麦品种的醇溶蛋白的SDS-PAGE电泳图谱。

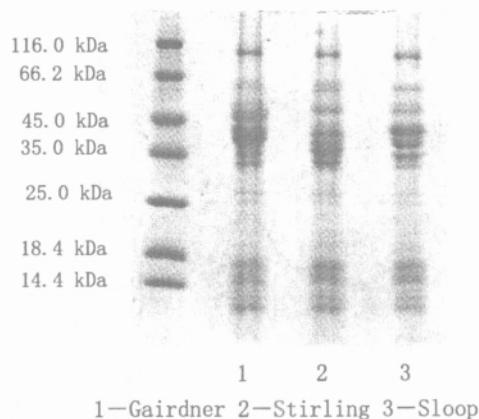


图1 3个澳大利亚啤麦品种醇溶蛋白的SDS-PAGE电泳图谱

图1表明,3个澳大利亚啤麦品种醇溶蛋白的SDS-PAGE电泳图谱的差异显著。运用Gel-Pro 3.1软件对图1进行分子量测定和图谱分析(见表1和图2)。其中,品种Gairdner在分子量45.0~66.0 kDa之间有5条谱带,上2下3;在30.0~45.0 kDa之间有8条谱带,其中7条带清晰可见。分子量47.4 kDa的谱带为该品种所特有。

品种Stirling在45.0~66.0 kDa间有4条谱带,上2下2;在30.0~45.0 kDa间有7条谱带,其中5条带清晰可见。42.9 kDa和36.0 kDa处谱带为该品种特有的。

品种Sloop在45.0~66.0 kDa间有4条谱带,上1下3;在30.0~45.0 kDa之间有6条谱带,其中3条谱带清晰可见。通过比较得出,该品种没有63.0 kDa谱带,而34.7 kDa, 37.9 kDa和41.4 kDa谱带为较强蛋白带。

澳麦品种间差异较大,在45.0~66.0 kDa和30.0~45.0 kDa区间,3个品种在蛋白谱带的数量、谱带类型和分子量上差异明显,可明显区分,见表2。澳麦Stirling蛋白最强谱带的分子量是36.0 kDa谱带,对应蛋白层析图谱中的最高峰,是其所特有的,明显的区别于Gairdner与Sloop。47.4 kDa谱带为Gairdner品种特有的,且区间带数为上5下8。Sloop区间带数为上4下6,无Gairdner和Stirling有的63.0 kDa谱带,而34.7 kDa, 37.9 kDa,

表 1 澳大利亚啤酒各品种的谱带分子量 (kDa)

谱带 (Rows)	品种			
	Marker	Gairdne	Stirling	Sloop
r1	116.0			
r2		102.6	100.7	96.8
r3	66.2	63.2	62.6	
r4		60.7	60.1	60.1
r5		52.9		52.3
r6		47.4	49.8	49.8
r7	45.0		42.9	
r8		41.8	40.7	41.4
r9		39.6	38.2	37.9
r10			36.1	
r11	35.0	35.4	34.7	34.7
r12		33.5	33.5	33.5
r13			31.9	32.7
r14		27.1	26.8	26.8
r15	25.0	25.3	25.0	24.8
r16		23.1		
r17		21.2	20.9	20.9
r18		19.7	19.5	
r19	18.4			18.9
r20		17.0	16.7	16.7
r21		14.9	15.4	15.1
r22	14.4	13.5		
r23		12.5	12.5	12.3
r24		11.1	11.1	11.1

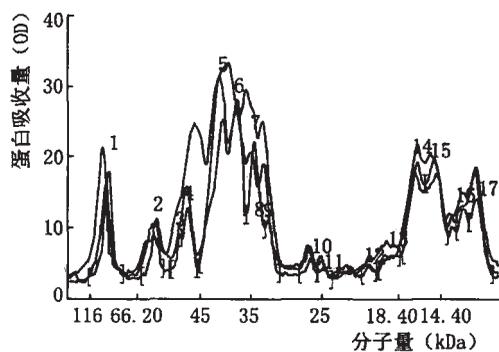


图 2 澳大利亚啤酒醇溶蛋白的蛋白层析图谱

41.4 kDa 谱带为蛋白强带, 是其主要特征。

2.1.2 法国啤酒图谱分析

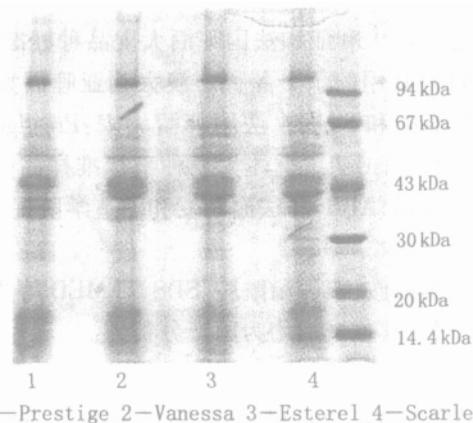
图 3 为 4 个法国啤酒品种的醇溶蛋白 SDS-PAGE 图谱, 运用 Gel-Pro 3.1 软件对图 1 进行分子量测定和图谱分析 (见表 3 和图 4)。依据分子量在 50.0~71.0 kDa 和 35.0~47.0 kDa 区间的蛋白谱带条数、带型和分子量差异明显分类成 3 组, 每组具有相同特征谱带类型, 总

表 2 澳大利亚啤酒谱带分析结果

品种	谱带带型		分子量 (kDa)			
	45.0~66.0kDa	30.0~45.0 kDa	63.0	47.0	43.0	36.0 32.0
Gairdner	5 条, 上 2 下 3	8 条, 清晰 7 条	+	+	-	-
Stirling	4 条, 上 2 下 2	7 条, 清晰 5 条	+	-	+	+
Sloop	4 条, 上 1 下 3	6 条, 清晰 3 条	-	-	-	+

注: “+” 在该分子量处存在蛋白谱带; “-” 在该分子量处不存在蛋白谱带。

结于表 4。第一组为 Prestige, 第二组为 Vanessa, 第三组包括 Esterel 和 Scarlett。这 3 组的差别在于 Prestige 与 Scarlett 的最强蛋白吸收峰分别在分子量 44.0 kDa 与 41.0 kDa 处, 而 Vanessa 有两个较强蛋白吸收峰分别在 44.0 kDa 与 41.0 kDa 处。



1-Prestige 2-Vanessa 3-Esterel 4-Scarlett

图 3 4 个法国啤酒品种醇溶蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱

表 3 法国啤酒各品种的谱带分子量 (kDa)

谱带 (Rows)	品种				
	Marker	Prestige	Vanessa	Esterel	Scarlett
r1		104.6	103.6	106.5	108.5
r2	94				
r3		70.9			
r4	67	65.8	65.4	66.2	66.6
r5		62.7	61.9	62.7	63.1
r6		58.0	57.6	58.7	58.3
r7		55.6	54.8	55.2	55.2
r8		53.2	53.2	53.2	53.2
r9		46.9		46.1	45.8
r10	43	44.2	43.8	43.4	43.4
r11		41.9	41.4		41.4
r12		40.3		40.9	39.3
r13		38.2	37.4	38.0	38.2
r14		36.4	35.8	36.6	36.6
r15		32.1	32.1	33.7	32.7
r16	30	29.4	29.6	29.4	30.3
r17		27.6	27.8	28.0	28.2
r18		26.6	26.2		27.2
r19		21.4	21.8	22.2	22.0
r20	20			19.7	19.6
r21		16.7	17.1	17.1	17.5
r22		15.9			16.3
r23			15.4	15.5	15.2
r24	14.4	13.6	13.7	14.0	14.1
r25		12.4		12.5	

Prestige 在 50.0~71.0 kDa 间有 6 条谱带, 上 3 下 3; 35.0~47.0 kDa 间有 6 条谱带, 其中 4 条为强带, 44.0 kDa 蛋白强带可作为鉴别 Prestige 特征谱带。Vanessa 在 50.0~71.0 kDa 间有 5 条谱带, 上 2 下 3; 在 35.0~47.0 kDa 间有 4 条谱带,

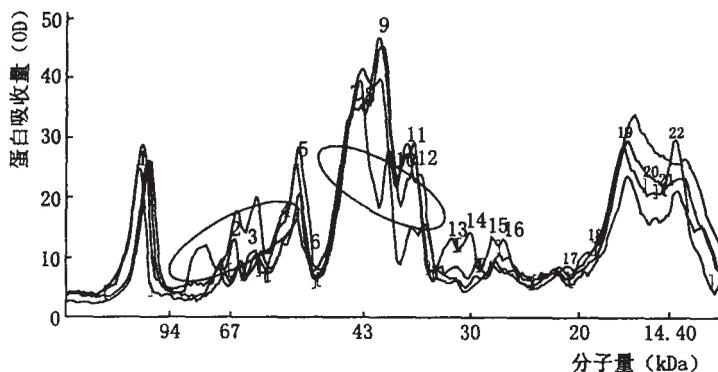


图4 法国啤麦醇溶蛋白的蛋白层析图谱

其中 41.4 kDa 和 43.8 kDa 蛋白强带为鉴别 Vanessa 的特征谱带。Esterel 在 50.0~71.0 kDa 间有 5 条谱带,上 2 下 3;在 35.0~47.0 kDa 间有 6 条谱带,也包括 4 条强带,其中 40.9 kDa 强带为鉴别 Esterel 特征谱带。Scarlett 在 50.0~71.0 kDa 之间有 6 条谱带,上 3 下 3;在 35.0~47.0 kDa 间有 6 条谱带,包括 4 条强带,其中 41.4 kDa 强带为鉴别 Scarlett 特征谱带,见表 4。

2.2 澳麦、法麦标准图谱库的建立

每一品种,在 Amersham miniVE 的一块胶板上进行 7 粒大麦醇溶蛋白的重复电泳,同时进行蛋白质标样。图 5,图 6 分别为澳麦 Stirling 和法麦 Esterel 醇溶蛋白的标准电泳图谱。

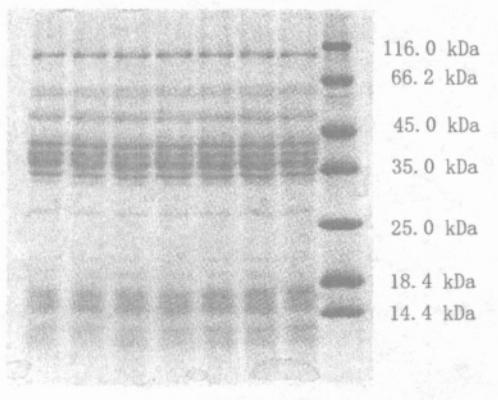


图5 Stirling 醇溶蛋白的标准电泳图谱

图 5,图 6 表明了,在重复试验中,不同籽粒的谱带类型表现一致,再次验证了大麦醇溶蛋白的电泳图谱是品种的属性,只与该品种的遗传特性相关。因此利用种子醇溶蛋白电泳图谱作为啤酒大麦的蛋白质“指纹”。通过试验,得到了 3 个澳麦品种和 4 个法麦品种的标准电泳图谱,组成了澳大利亚和法国啤麦标准图谱库,为以

表 4 法国啤麦谱带分析表

品种	谱带类型		分子量(kDa)			
	50.0~71.0kDa	35.0~47.0kDa	4 条清晰谱带分别为:			
Prestige	6 条, 上 3 下 3	6 条, 清晰 4 条; 最强带 1 条 44 kDa	32.0	36.0	38.0	44.0
Vanessa	5 条, 上 2 下 3	4 条, 清晰 4 条; 最强带 2 条 41.44 kDa	36.0	37.0	41.0	44.0
Scarlett	6 条, 上 3 下 3	6 条, 清晰 4 条; 最强带 1 条 41 kDa	37.0	38.0	39.0	41.0

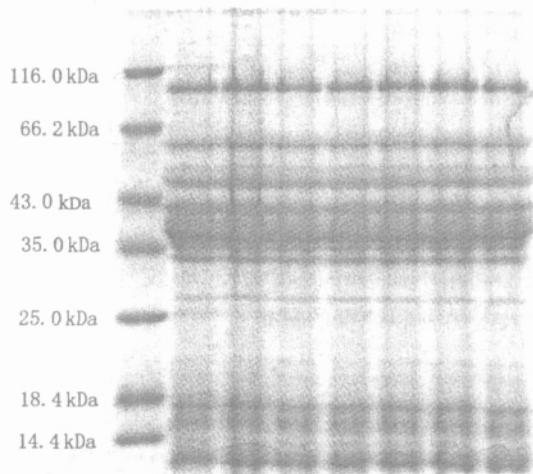


图6 Esterel 醇溶蛋白的标准电泳图谱

后进行进口啤麦的品种鉴定提供了参照物。

2.3 澳麦、法麦品种系谱分析

利用得到的澳麦、法麦标准电泳图谱库,分别对其进行聚类分析。对于电泳图谱中同一分子量的蛋白谱带,有带计为 1,无带计为 0。列出 0,1 矩阵,用 Cross Checker 2.8 软件进行统计分析。每处蛋白带计作一个位点。用 MEGA 3 软件对加麦品种进行 UPGMA 分析。其中,遗传距离的计算按 Lynch^[5]的计算方法:

$$\text{遗传距离 } G_{dxy} = 1 - 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

其中 N_{xy} 是个体 x 和个体 y 共有位点数, N_x 和 N_y 分别是个体 x 和个体 y 所有的位点数,结果见图 7,图 8。图 7,图 8 的结果表明与传统的分类结果是相近的。

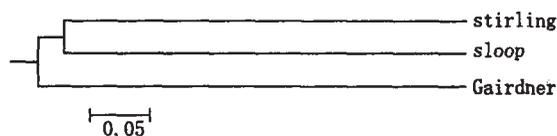


图7 澳麦品种的聚类分析图

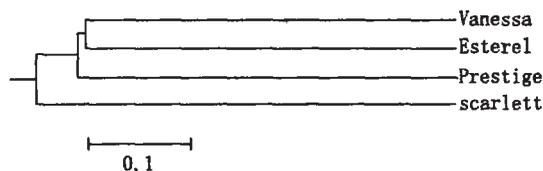


图8 法麦品种的聚类分析图

2.4 进行酿造大麦品种混种试验,检测大麦品种纯度

结合青啤公司常用的啤麦品种,选取 3 个法国啤麦品种 Prestige, Vanessa 和 Esterel 作为代表(所用大麦皆为种子标准样品),设计了混种试验,具体方案见表 5。每个试验共进行 100 粒混种大麦的电泳,其中有一个为主要品种。试验结果表明,可由醇溶蛋白的

表 5 啤麦混种试验设计

试验 序号	主要 品种	样品组成		
		品种(粒数)	品种(粒数)	品种(粒数)
1	Prestige	Prestige(94)	Scarlett(6)	
2	Esterel	Esterel(88)	Vanessa(6)	Prestige(6)

电泳图谱(图9)明显区分出混入主要品种中的少数其他大麦品种,如试验2中混入Vanessa和Prestige。这再次验证了利用本研究中的蛋白质“指纹”技术可成功进行啤酒大麦品种和纯度的鉴定。

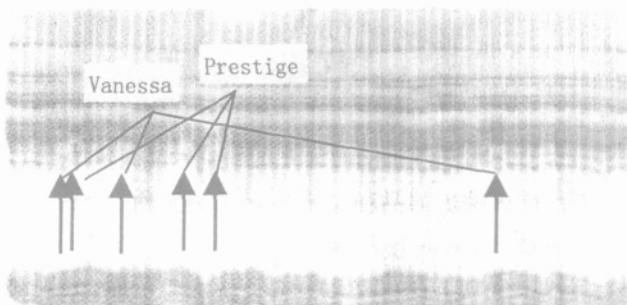


图 9 啤麦混种试验醇溶蛋白的电泳图谱

3 结论

3.1 利用 Gel-Pro 软件对 7 个常用品种的啤酒大麦醇

溶蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱进行分析比较,建立了 3 个澳大利亚啤麦品和 4 个法国啤麦品种的标准蛋白“指纹”图谱库,为进口啤麦品种真实性和纯度的鉴定提供了标准参比物。并利用电泳图谱,分别对供试的啤麦品种进行了遗传聚类分析,与传统的分类方法结果相近。

3.2 通过人工混种试验,构建了进口啤酒大麦混种图谱库,证明本研究中的蛋白质“指纹”技术完全适用于进口啤酒大麦的品种纯度的鉴定。

参考文献:

- [1] 汪军妹,张国平. 大麦籽粒蛋白质含量的研究进展[J]. 大麦科学,1999,(6):9-11.
- [2] 薛洁. 大麦蛋白质的组成研究[J]. 酿酒科技,2003(4):67-69.
- [3] Draper SR. ISTA variety committee report of the working group for biochemical tests for cultivar identification[J]. Seed Sci & Technol, 1987,(15):431-434.
- [4] 石思信,张志娥,肖建平. 利用蛋白质聚丙烯酰胺电泳法鉴定水稻种子纯度[J]. 北京农业科学,1996,(14):8-9.
- [5] Lynch M. The similarity index and DNA fingerprinting[J]. Mol Biol Evol,1990,(7):478-484.
- [6] Lynch M. DNA fingerprinting approaches and applications [J]. Switzerland Basel,1991,(48):113-126.

酒不醉人 報醉人

《华夏酒报》主要内容:
今日要闻、今日看点、市场新闻、市场观察、营销实战、营销新知、热点新闻、白酒专刊、葡萄酒专刊、啤酒专刊、超级赢家、产业动态、公司新闻、国际酒业和副刊等。
《华夏酒报》为四开(长报)16-24版,彩色印刷,每周3期,全年订价150元,每月订价13元。
邮发代号:38-109,国内统一刊号:CN67-0036,国际代号:04354

品牌内酒:权威、专业、公信力;
报端风格:服务特色、专业品质;
办报宗旨:评述市场热点,解析行业政策,提供服务信息,引导消费潮流。

华夏酒报
中国酒业市场风向标