

doi: 103969/j.issn.0490-6756.2017.01.033

# 川滇琼地区麻疯树种子核糖体失活蛋白资源调查

杨 千, 吉柔风, 李晨阳, 张杨雪, 余洪武, 陶成秋, 陈 放, 徐 莺

(四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室,  
能源植物生物燃油制备与利用国家地方联合工程实验室, 成都 610064)

**摘 要:** 本研究对西昌、攀枝花、仁里、海口、三亚、东方六地的麻疯树种子进行资源调查研究, 结果显示六个地区麻疯树种子胚乳核糖体失活蛋白含量均值为 1.8770~2.5602 mg/g, 由高到低依次为西昌、三亚、海口、仁里、攀枝花、东方, 且地区间差异较大. 各地区内部种子胚乳核糖体失活蛋白含量数据分析显示, 仁里地区种子胚乳核糖体失活蛋白含量变异系数最大, 为 14.6189; 海口地区的变异系数最小, 为 7.1876. 麻疯树种子性状相关性分析结果显示胚乳核糖体失活蛋白含量与百粒重、出仁率值在 0.01 水平上没有相关性, 与含油率相关性不显著, 与可溶性蛋白含量在 0.01 水平上低度负相关. 综合各项指标认为西昌地区的麻疯树种子核糖体失活蛋白含量较高, 可作为现阶段核糖体失活蛋白应用的材料来源之一.

**关键词:** 麻疯树; 核糖体失活蛋白; 资源调查

**中图分类号:** Q-9      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0490-6756(2017)01-0197-06

## An investigation on the curcin resources of *Jatropha* seed collected from Sichuan, Yunnan and Hainan Province

YANG Qian, JI Rou-Feng, LI Chen-Yang, ZHANG Yang-Xue,  
YU Hong-Wu, TAO Cheng-Qiu, CHEN Fang, XU Ying

(National and Local Co-Engineering Laboratory of Energy Plant Bio-fuel Production and Utilization,  
Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education,  
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract:** The *Jatropha curcas* L. seeds collected from 6 individual locations (Xichang, Panzhihua, Haikou, Sanya and Dongfang) were analyzed in this study. The results showed that the average curcin contents in the endosperms were among 1.8770~2.5602 mg/g following the order from high to low: Xichang, Panzhihua, Haikou, Sanya and Dongfang, showing large content variation among them. The analysis on the coefficient of variation (CV) of curcin contents within a population found that the highest CV (14.6189) is from Renli while the lowest one (7.1876) from Haikou. The correlation analysis suggests non-relationship between curcin content with 100-seed weight and kernel yield, non-obvious relationship with oil content and low negative relationship with soluble protein contents at the level of 0.01. Based on these data, the seeds from Xichang with relative higher curcin content could be used as one of resources for the further application at present.

**Keywords:** *Jatropha curcas* L.; Ribosome inactivating protein content; Resources investigation

收稿日期: 2015-06-29

基金项目: “十二五”科技支撑项目(2011BAD22B08)

作者简介: 杨千(1990-), 女, 湖南芷江人, 硕士研究生, 研究方向为植物天然产物. E-mail: 543858801@qq.com

通讯作者: 徐莺. E-mail: xuying@scu.edu.cn

## 1 引言

麻疯树(*Jatropha curcas* L.) 是大戟科植物,原产于中美洲,在我国主要分布于粤、桂、贵、川、滇、琼等热带亚热带地区,麻疯树适应性强<sup>[1-4]</sup>,其分布地区海拔从 100m 到 1700m 不等,在年均温 18℃ 以上,积温 4500℃ 以上,降雨量 480~2380mm 均可生长<sup>[5]</sup>. 分子遗传标记分析结果显示在我国的麻疯树树种遗传变异率较低,且其遗传关系远近与地理分布无必然关联<sup>[6]</sup>,我国的这些树种多为人工栽培树种,其分布受人为影响较大,麻疯树在我国大约有 300 多年的栽培历史,传统上主要是利用其药用价值,其种子、根、叶、树皮均可入药,在我国民间主要用他来止痛、消毒、利尿、治疗创伤<sup>[7]</sup>.

随着如今能源危机愈演愈烈,人们把焦点关注在麻疯树种子较高的含油率上,其生产出的柴油已经投入市场,从麻疯树种子到生物柴油的产业链也在逐步完善,但是由于目前的栽培树种大部分未被驯化,导致现有的麻疯树人工林出现了产量不高且不稳定的状况<sup>[8]</sup>,严重制约着与麻疯树相关的生物柴油产业的发展. 针对这一瓶颈,研究者一方面致力于优异种质资源的筛选和培育,另一方面致力于开发麻疯树的综合利用平台,以期在产量有限的背景下最大限度地发挥麻疯树的利用价值,降低产业风险.

麻疯树核糖体失活蛋白 curcin 是麻疯树的有效活性成分之一,针对 curcin 的研究正在推进,现阶段的研究<sup>[9-12]</sup>主要集中在其抗肿瘤<sup>[13-15]</sup>,抗病毒,抗真菌的生物活性上<sup>[15]</sup>. curcin 纯化技术的不断发展使获得大量高纯度的麻疯树核糖体失活蛋白成为可能<sup>[17]</sup>,这也为后续的研究提供了支持,有望构建一条围绕 curcin 医药开发的产业链.

在对麻疯树核糖体失活蛋白的开发利用方面,天然 curcin 与原核表达 curcin 相比在蛋白质折叠、修饰方面具有优势,对天然 curcin 进一步的深入研究和推广应用需要有充足的资源保障. 因此调查研究麻疯树种子核糖体失活蛋白资源,建立一套以种子 curcin 含量为主要参考依据的良种筛选及培育方案非常具有战略意义.

## 2 材料和方法

### 2.1 材料

当年生麻疯树(*Jatropha curca* L.) 种子采集于四川省西昌市、四川省攀枝花市、云南省仁里镇、海南省海口市、三亚、东方等地区,在采样地区选择距离大于 500 m 的 10 个样株采集种子样本. 在所采种子样本中随机挑选成熟、质地饱满、外部无病虫害、无损伤的麻疯树种子作为待测样品. 每个样株选三粒种子作重复测定. 各调查地点概况见图 1.

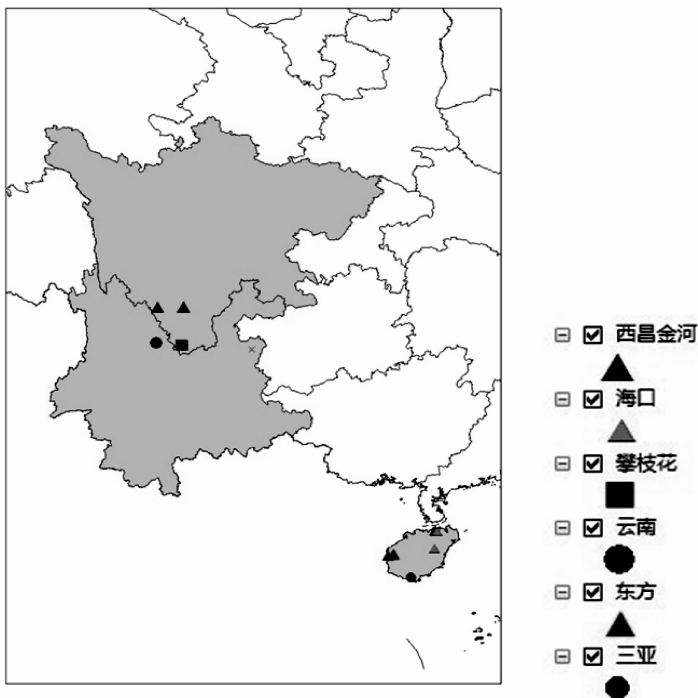


图 1 采样地区分布图

Fig. 1 The distribution of the plots

## 2.2 实验方法

2.2.1 种子百粒重的测定 除去每个样点所采种子中的杂质,采用十字区分法随机取 100 粒完好的种子,在精度为 0.001g 的电子天平上称重,3 次重复。

2.2.2 种子出仁率的测定 在每个样点所采的种子中随机取 100 粒完好的种子,称量记录,剥壳后,称量种仁的质量,种子出仁率(%)=(种仁百粒重/种子百粒重)×100%,3 次重复。

2.2.3 种子含油率的测定 本实验参考雷蕾等<sup>[18]</sup>的核磁共振分析含油率方法,使用 NMI-20Analyst 核磁共振仪测定,射频单元为 NM-2010。

仪器的参数选择:室温 22℃,核磁共振仪检测腔温度为 36℃,样品管直径为 1.3cm,高度为 20cm,脉冲序列为硬脉冲回波,采样点数为 1024,带宽为 100.00kHz,RG1(增益细调)为 50,RG2(增益粗调)为 5,TR(重复时间)为 800ms,回波时间为 7 000 μs,扫描次数 NS=16。称取种子质量,输入程序,经扫描后系统给出种子含油率值。

2.2.4 种子可溶性蛋白的提取与测定 参考谢瑜<sup>[19]</sup>的麻疯树种仁蛋白质提取方法,为谷瑞升<sup>[20]</sup>改良丙酮沉降法提取。将选取的单粒种子胚乳加 10%聚丙烯吡咯烷酮(PVP),液氮研磨后,各加入 300ul 提取缓冲液(5mmol/L, pH 7.2 磷酸缓冲液)置于 4℃ 旋转混匀 2h;在 4℃ 下 12 000g,离心 20 min,收集中层液体;加入 5 倍体积的 -20℃ 预冷丙酮, -20℃ 放置 2h 沉淀蛋白质;4℃ 离心, 12000g, 20 min, 去上清;沉淀在 -20℃ 放置 20min 使丙酮完全挥发;将沉淀充分溶解于 1mL 提取缓冲液中,离心,4℃, 12000g, 20min;上清置于 -20℃ 保存。

采用 BCA 法<sup>[20]</sup>测定蛋白质浓度(Thermo 公司),将待测样品 OD 值代入标准曲线得出相应的可溶性蛋白含量。

2.2.5 种子 curcin 含量的测定 采用间接非竞争 ELISA 法<sup>[21]</sup>检测种子中 curcin 的含量。用碳酸盐缓冲液(pH 9.6)将麻疯树 curcin 纯品稀释一定梯度,包被 96 孔酶标板(Corning 公司),同时做空白、阳性、阴性对照,4℃ 静置过夜;次日倒去包被液,PBS-T(pH7.4)洗涤酶标板;再用 PBS-T(pH7.4)稀释的 2% 封闭用山羊血清封闭,37℃ 孵育 2 h,倒去封闭液,PBS-T 洗涤甩干;在 96 孔酶标板上添加经 PBS-T(pH7.4)稀释的鼠源麻疯树 curcin 单抗 100μL,空白孔加 100μL PBS-T,37℃ 孵育 2h,倒去单抗液,用 PBS-T 洗涤;接着加入经 PBS-T(pH7.4)稀释 1:5000 倍辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 液 100μL/孔,空白孔加 PBS-T,37℃ 孵育 1 h,用 PBS-T(pH7.4)洗涤甩干;添加显色底物 TMB,37℃ 孵育 15 min;最后,加 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50μL/孔,终止反应。使用酶标仪在 450 nm,630nm 波长处测量吸光值 OD<sub>450</sub>, OD<sub>630</sub>。

2.2.6 数据计算分析方法 上述实验数据统计及分析均运用 Excell 软件和 SPSS17.0 统计分析软件。统计各性状的频率分布,并使用 AVON 方差分析统计同一种源地内部不同样株之间及不同种源地样株之间的差异性;按照公式,用 Excell 计算出同一种源地内部不同样株之间和不同种源地样株之间的变异系数;采用 Pearson 相关分析探讨比较各指标与种子 curcin 含量之间的相关关系的程度和方向。

## 3 结果与分析

### 3.1 种子百粒重测定结果

不同采样地麻疯树种子百粒重测定结果如表 3-1 所示,由结果可以看出六个种源地种子的百粒重平均水平为 68.840~75.882 g 之间,从高到低依次为西昌>攀枝花>东方>仁里>三亚>海口,各组内部变异系数 4.364%~7.392%。

表 1 不同样地麻疯树种子百粒重(g)

Tab.1 The 100-seed weight analysis of *Jatropha curcas* from different provenances(g)

	西昌 JH	攀枝花 LZ	仁里 RL	三亚 SY	海口 HK	东方 DF
均值(Mean)	75.882±1.027	72.558±0.688	71.722±0.774	69.530±1.292	68.840±0.523	72.416±1.030
极大值(Mix)	89.232	78.600	79.788	78.542	74.284	79.254
极小值(Mix)	67.316	65.400	61.970	59.283	61.298	56.702
标准差(Standard deviation)	5.3385	3.7690	4.2394	5.4819	3.0040	5.3532
变异系数(CV)	7.035	5.194	5.911	7.884	4.364	7.392

### 3.2 种子出仁率测定结果

种子出仁率测定结果如表 2 所示,由结果可以看出六个种源地的种子出仁率平均水平为 62.

3819%~65.146%,从高到低以此为西昌>三亚>海口>东方>攀枝花>仁里,种源地内部变异系数为 0.2727%~0.4182%.

表 2 不同样地麻疯树种子出仁率(%)

Tab. 2 The kernel/seed ratio analysis of *Jatropha curcas* from different provenances(%)

	西昌 JH	攀枝花 LZ	仁里 RL	三亚 SY	海口 HK	东方 DF
均值(Mean)	65.146±0.2747	63.4867±0.4086	62.3819±0.2727	64.5145±0.2909	63.9079±0.2992	63.8472±0.4182
极大值(Mix)	68.1013	68.4884	65.3004	66.7526	66.8539	67.3584
极小值(Mix)	62.0255	59.8507	60.0084	62.8814	60.1027	60.2657
标准差 (Standard deviation)	1.4276	2.2378	1.4935	1.2342	1.7187	2.1730
变异系数(CV)	0.2747	0.4086	0.2727	0.2909	0.2992	0.4182

### 3.3 种子含油率测定结果

种子含油率测定结果如表 3-3 所示,由结果可以看出六个种源地的种子含油率平均水平为

34.4945%~39.1157%,从高到低依次为仁里>西昌>攀枝花>三亚>东方>海口,含油率的分布区间和区内变异系数为 5.170%~11.631%.

表 3 不同样地麻疯树种子含油率(%)

Tab. 3 The seed oil content analysis of *Jatropha curcas* from different provenances(%)

	西昌 JH	攀枝花 LZ	仁里 RL	三亚 SY	海口 HK	东方 DF
均值(Mean)	38.1900±0.6033	38.0740±0.8085	39.1157±0.3692	37.4228±0.5917	34.4945±0.4242	36.1685±0.4323
极大值(Mix)	43.86	43.94	42.78	41.85	38.11	39.91
极小值(Mix)	31.70	20.44	34.58	33.49	28.57	30.99
标准差 (Standard deviation)	3.1351	4.4284	2.0223	2.5102	2.4367	3.3146
变异系数(CV)	8.2091	11.6310	5.1700	6.7078	7.0639	6.2116

### 3.4 种子可溶性蛋白含量测定结果

种子可溶性蛋白含量测定结果如表 3-4 所示,由结果可以看出六个种源地的种子可溶性蛋白含量平均水平为 84.1936~148.8571 mg/g,从高

到低依次为攀枝花>海口>仁里>东方>三亚>西昌,种源地内部变异系数为 5.6477%~16.1839%.

表 4 不同样地麻疯树种子可溶性蛋白含量(mg/g)

Tab. 4 The seed soluble protein content analysis of *Jatropha curcas* from different provenances(mg/g)

	西昌 JH	攀枝花 LZ	仁里 RL	三亚 SY	海口 HK	东方 DF
均值(Mean)	84.1936±2.6223	148.8571±3.0519	122.7033±3.0772	107.5980±2.3518	126.0213±1.2390	117.0892±3.4551
极大值(Mix)	107.2241	173.8747	142.7409	121.4538	139.4326	147.8631
极小值(Mix)	55.4379	119.8701	84.3798	90.6871	102.8790	89.4380
标准差 (Standard deviation)	13.6258	16.7158	16.8545	9.9778	7.1174	17.9532
变异系数(CV)	16.1839	11.2294	13.7360	9.2732	5.6477	15.3329

### 3.5 种子核糖体失活蛋白含量测定结果

麻疯树种子 curcin 含量测定结果如表 3-5 所示,由结果可以看出六个种源地的种子 curcin 含量平均水平为 1.8770~2.5602,各种源地的参数指标从高到低依次为西昌>三亚>海口>仁里>攀枝花>东方.其中西昌地区的麻疯树种子 curcin

含量较高,达到 2.5602 mg/g,与其他地区种子的 curcin 含量之间有极显著差异,东方地区麻疯树种子 curcin 含量较低,为 1.8770 mg/g.在各种源地内部,麻疯树种子 curcin 含量的变异系数为 7.1876~14.6189,由小到大依次为海口<东方<三亚<西昌<攀枝花<仁里.

表 5 不同样地麻疯树种子 curcin 含量及多重分析(LSD)结果(mg/g)

Tab. 5 Curcin contents of *Jatropha curcas* seeds from different provenances and the results of LSD assay(mg/g)

	西昌 JH	攀枝花 LZ	仁里 RL	三亚 SY	海口 HK	东方 DF
均值(Mean)	2.5602±0.0497A	1.8992±0.0442D	2.1107±0.0563BC	2.1956±0.5061B	2.1793±0.0273C	1.8770±0.0345E
极大值(Mix)	3.0746	2.2039	3.0458	2.5649	2.5421	2.1124
极小值(Mix)	1.9907	1.3374	1.7346	1.8746	1.9746	1.5231
标准差 (Standard deviation)	0.2584	0.2421	0.3086	0.2147	0.1567	0.1780
变异系数(CV)	10.0947	12.7458	14.6189	9.7799	7.1876	9.4851

注:  $\alpha=0.01$ , A、B、C、D、E 表示差异, 字母相同为差异不显著

### 3.6 各种源地种子核糖体失活蛋白含量与其他性状的相关性分析

Pearson 相关分析结果如表 6 所示, 麻疯树

curcin 含量与百粒重、出仁率、含油率参数指标的相关程度很弱, 与可溶性蛋白含量有低度相关性且呈现负相关。

表 6 麻疯树种子性状的相关性分析

Tab. 6 The trait correlation analysis of *Jatropha curcas* seeds

	百粒重	出仁率	含油率	可溶性蛋白含量	curcin 含量
百粒重		0.145	-0.027	-0.206**	0.202**
出仁率			0.108	-0.156*	0.290**
含油率				-0.011	-0.030
可溶性蛋白含量 curcin 含量					-0.470**

\* 表示 0.05 水平有显著差异; \*\* 表示 0.01 水平有显著差异

## 4 讨 论

本研究以麻疯树种子核糖体失活蛋白 curcin 含量为主要参考指标, 筛选种质资源, 选取了西昌、攀枝花、仁里、海口、三亚、东方六地作为采样点, 胚乳 curcin 含量检测结果显示, 各地区 curcin 含量均值最高为 2.5602mg/g, 分布在西昌地区, 均值最低为 1.8770mg/g, 分布在东方地区。另外仁里、三亚、海口三地的种子 curcin 含量都在 2.1mg/g 以上, 而攀枝花略低为 1.8992mg/g, LSD 多重分析结果可以看出各地区之间的种子 curcin 含量差异性较大。对各种源地内部种子 curcin 含量的变异系数分析可知, 海口地区变异系数最低, 为 7.1876, 仁里地区最高, 为 14.6189。此结果可以为目前麻疯树 curcin 的应用提供参考。

结合百粒重、出仁率、含油率和可溶性蛋白含量的检测值, 分析了 curcin 含量与这几个种子性状的相关性, 结果显示胚乳 curcin 含量与种子百粒重和出仁率在 0.01 水平上无相关性, 与含油率相关性不显著, 与可溶性蛋白含量在 0.01 水平上呈低度负相关, 种子 curcin 含量与这几个种子性状无相关性或相关性太低, 分析其原因, 一般来说

表型的差异是由基因组的遗传变异和环境适应性修饰共同作用的结果。从环境方面来说可能受到地区间生态环境差异以及栽种方式不同的影响, 从遗传变异角度, 由于 curcin 的表达是由多基因家族调控, 有可能在发育过程中出现表达量的差异。种子 curcin 含量与其他性状相关度不高说明他们在各自的生物学功能及产生机理上各自独立, 具体机制有待进一步研究。

由于麻疯树种子 curcin 含量变异系数较高且不同地区差异显著性较高, 因此针对 curcin 含量的资源调查结果可指导 curcin 资源的深入研究和应用。相关的分子遗传方面的研究结果认为我国的麻疯树资源遗传变异率较低<sup>[23]</sup>, 不同地区的种质资源分子水平的遗传多样性不高, 但表观性状指标变异率较高, 稳定性偏低。从未来优异种质资源育种推广方面来说, 为了培育出稳定高产的新品种, 在不影响本地物种多样性的前提下, 在亲缘关系较远的麻疯树居群之间进行远源杂交, 可能更加有利于优化我国的麻疯树品质, 为未来产业化生产提供保障。

### 参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:

- 第二分册[M]. 北京: 科学出版社, 1996, 148.
- [2] 郑万均. 中国树木志:第三卷[M]. 北京: 中国林业出版社, 1998, 2977.
- [3] 陈翼胜, 郑硕. 中国有毒植物[M]. 北京, 科学出版社, 1987, 258.
- [4] 蒋楠, 荣熔, 田金华, 等. 麻疯树活性氧水平及酶类清除系统对温度胁迫的差异应答研究[J]. 四川大学学报:自然科学版, 2015, 52(6): 1375.
- [5] 丘兴华. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [6] 沈俊岭. 麻疯树遗传变异与多样性研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2010.
- [7] Asase A, Oteng-Yeboah A A, Odamtten G T, *et al.* Ethnobotanical study of some Ghanaian antimalarial plants [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 99 (2):273.
- [8] Fairless D. Biofuel; the little shrub that could-maybe[J]. *Nature*,2007,449(7163): 652.
- [9] Desvoyes B, Poyet J L, Schlick J L, *et al.* Identification of a biological inactive complex form of poke-weed antiviral protein [J]. *FEBS Letters*, 1997, (410): 303.
- [10] Joerg F R, Christine B M, Donald E N, *et al.* Induction of a ribosome-inactivating protein upon environmental stress [J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 35: 701.
- [11] Reinbothe S, Mollenhauer B, Reinbothe C. JIPs and RIPs: the regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens[J]. *Plant Cell*, 1994,6:1197.
- [12] Stirpe F, Barbieri L, Gorini P, *et al.* Activities associated with the presence of ribosome-inactivating proteins increase in senescent and stressed leaves [J]. *FEBS, Lett*, 1996, 382: 309.
- [13] 黄得如, 黄东宏, 郭似旋, 等. 麻疯树毒素的分离及其某些性质[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1991, 18(2): 149.
- [14] Stripe F, Pession-Brizzi A, Lorenzoni E. Studies on the proteins from the seeds of *Croton togliumand* of *Jatropha curcas* [J]. *Biochemistry Journal*, 1976, 156 (1): 1.
- [15] Barbieri L, Battelli M G, Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins from plants[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1993, 1154: 237.
- [16] 蒋华梅, 杨松, 胡德禹, 等. 麻疯树 Curcin 蛋白农药和医用生物活性研究进展[J]. *农药*, 2007 (1): 10.
- [17] 林娟, 颜钊, 唐琳, 等. 麻疯树核糖体失活蛋白的分离纯化和作用机制研究[J]. *高技术通讯*, 2002 (11): 36.
- [18] 雷蕾, 梁慧, 彭彤, 等. 核磁共振法测麻疯树种子油含量的研究[J]. *种子*, 2009(05): 78.
- [19] 谢瑜. 麻疯树(*Jatropha curcas* L.)种子核糖体失活蛋白(curcin)的分离纯化、单粒种子含量及其与种子其它性状的相关性研究 [D]. 成都: 四川大学生命科学学院, 2012.
- [20] 谷瑞升, 刘群录, 陈雪梅, 等. 木本植物蛋白提取和 SDS-PAGE 分析方法的比较和优化[J]. *植物学通报*, 1999,16(2): 171.
- [21] 汪家政, 范明. 蛋白技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [22] 辜小苹, 蔡峰, 朱习红, 等. 酶联免疫吸附法测定麻疯树核糖体失活蛋白[J]. *应用与环境生物学报*. 2011, 17(2): 227.
- [23] 何玮. 麻疯树遗传多样性的 ISSR 分析[D]. 成都: 四川大学, 2007.