麦类作物学报 2023,43(2):174－181
Journal of Triticeae Crops doi: 10.7606/j.issn.1009-1041.2023.02.06

网络出版时间:2023-02-13
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail//61.1359.S.20230210.1415.008.html

反相超高效液相色谱分析小麦麦谷蛋白组分研究

郭 雷[1],陈怡菲[1],李世权[1],王卿儒[1],王萍萍[1],蒋志凯[2],高 欣[1]
(1.西北农林科技大学农学院,陕西杨凌 712100; 2.河南省新乡市农业科学院,河南新乡 453002)

摘 要:为利用反相超高效液相色谱(RP-UPLC)分离、定量分析小麦麦谷蛋白组分,研究了流动相比例、洗脱时间、柱温、流速和进样量对色谱分离结果的影响,并利用新建立的分离麦谷蛋白亚基的方法分析了基因型及环境对麦谷蛋白组分的影响。结果表明,最优的洗脱程序为79%的流动相A(含0.08%三氟乙酸的超纯水)和21%的流动相B(含0.08%三氟乙酸的乙腈溶液)洗脱5 min,在25 min内,流动相A逐渐降低至48%,流动相B逐渐增加至52%,最后维持5 min,柱温、流速和进样量分别为55 ℃、0.5 mL·min^{-1}和16 μL,该方法可以精确分离至少11种高分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)。单个HMW-GS的相对含量和HMW-GS与低分子量麦谷蛋白亚基(LMW-GS)的比值均受基因型和环境的影响,且基因型的影响大于环境。

关键词:小麦;麦谷蛋白;反相超高效液相色谱;定量分析
中图分类号:S512.1;S330 **文献标识码**:A **文章编号**:1009-1041(2023)02-0174-08

Study on Wheat Glutenin by Reversed-Phase Ultra-Performance Liquid Chromatography

GUO Lei[1], CHEN Yifei[1], LI Shiquan[1], WANG Qingru[1], WANG Pingping[1], JIANG Zhikai[2], GAO Xin[1]
(1. College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;
2. Xinxiang Academy of Agricultural Sciences, Xinxiang, Henan 453002, China)

Abstract: In order to separate and quantitatively analyze the components of wheat glutenin by reversed-phase ultra-performance liquid chromatography(RP-UPLC), the effects of elution solution ratio, elution time, column temperature, flow rate and injection volume on chromatographic separation results were studied, and the method for separating glutenin subunits was established, which was further used to study the effects of genotype and environment on glutenin components. The optimal elution program was 79% of elution solution A(deionized water containing 0.08% trifluoroacetic acid) and 21% of elution solution B(acetonitrile deionized water containing 0.08% trifluoroacetic acid) for 5 minutes; Within 25 minutes, elution solution A was gradually decreased to 48%, and elution solution B was gradually increased to 52%, followed by maintaining for 5 minutes. The optimal column temperature, flow rate and injection volume were 55 ℃, 0.5 mL·min^{-1} and 16 μL. This method can accurately separate at least 11 kinds of high molecular weight glutenin subunit(HMW-GS). The relative content of individual HMW-GS, and the ratio of HMW-GS to low-molecular-weight glutenin subunits (LMW-GS) were affected by genotype and planting environment, and the influences of genotype were greater than that of environment.

Key words: Wheat; Glutenin; Reversed-phase ultra-performance liquid chromatography; Quantitative

收稿日期:2022-03-15 修回日期:2022-06-05
基金项目:陕西省大学生创新训练计划项目(S202110712334)
第一作者 E-mail:1745605576@qq.com
通讯作者:高 欣(E-mail:bestgaoxin@nwsuaf.edu.cn)

analysis

小麦是世界上最重要的粮食作物之一,为人类提供了 21%以上的能量和超过 20%的蛋白质[1]。小麦的贮藏物质主要包括淀粉和蛋白质,蛋白质包括醇溶蛋白、麦谷蛋白、清蛋白和球蛋白,其中麦谷蛋白又分为高分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)和低分子量麦谷蛋白亚基(LMW-GS)[2]。普通小麦中的 HMW-GS 由位于第一部分同源群染色体短臂上的 *Glu-A1*、*Glu-B1* 和 *Glu-D1* 位点编码,其中每个位点分别编码一个 x 型和 y 型亚基。研究表明,HMW-GS 的含量和组成均会影响小麦的品质特性,如 Dx5+Dy10 亚基对面团品质的贡献大于 Dx2+Dy12[3];过表达 Bx7 可以提高面筋中 β-折叠的含量,促进谷蛋白聚合体的积累,优化面筋蛋白的微观结构,进而提高面团的弹性和稳定性[4]。LMW-GS 约占麦谷蛋白的 60%,由位于第一同源群染色体短臂上的 *Glu-A3*、*Glu-B3* 和 *Glu-D3* 位点编码,通常会影响面团的粘性和延展性[5]。研究表明,HMW-GS 与 LMW-GS 的比值(H/L)与面团的延伸面积和延伸性显著正相关[6]。麦谷蛋白的含量和组成对面团特性具有决定性作用,定量分析麦谷蛋白的组分对于研究小麦的品质具有重要意义。

分离麦谷蛋白组分的常用方法有十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、反相高效液相色谱(RP-HPLC)、高效毛细管电泳(HPCE)、双向凝胶电泳(2-DE)、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)等[7-11],其中 SDS-PAGE 和 RP-HPLC 是分离麦谷蛋白最常用的方法。SDS-PAGE 通常用于麦谷蛋白组成的鉴定,简单易行;RP-HPLC 是根据亚基的亲水性对其进行区分,具有精确、全自动且重现性高等优点[12],且可以用于麦谷蛋白组分的定量,如单个亚基的含量和 H/L 测定[4]。反相超高效液相色谱(RP-UPLC)是在 RP-UPLC 的基础上发展起来的一种新的分离检测技术。与 RP-HPLC 相比,RP-UPLC 具有分离速度更快、分辨率更高、灵敏度更高等优点,已逐步代替 RP-HPLC 广泛应用于食品、化工、生物、医药等领域[13-16]。Lee 等[17]和 Yu 等[18]分别建立利用 RP-UPLC 高效分离 HMW-GS 和 LMW-GS 的方法。然而,还没有研究基于 RP-UPLC 的图谱定量计算单个 HMW-GS 的相对含量和 H/L。本研究拟建立新的麦谷蛋白的分离方法,用 5 个麦谷蛋白组成不同的材料验证新建方法的可行性,并利用该方法研究种植地点对麦谷蛋白组分的影响,为定量分析麦谷蛋白组分进而评估面团的品质特性提供参考。

1　材料与方法

1.1　试验材料

本研究以中国春(HMW-GS 组成为 Bx7+By8 和 Dx2+Dy12)为材料确立 RP-UPLC 分离麦谷蛋白的最佳条件,以西农 979、西昌 69、济南 17、新麦 18 和新麦 26 为材料验证新建方法的可行性。以新乡农科院提供的分别于 8 个地点(辉县市、新乡县、获嘉县、长葛市、襄城县、南乐县、巩义市和浚县)收获的新麦 26 为材料,研究种植环境对麦谷蛋白组分的影响。小麦籽粒润麦后磨粉,过 100 目筛后保存于 4 ℃冰箱备用。

1.2　试验方法

1.2.1　麦谷蛋白提取

参考李少鹏[19]的方法提取麦谷蛋白。称取小麦面粉 100 mg 置于 1.5 mL 离心管,加入 1 mL 50%正丙醇,混合均匀后 65 ℃水浴 10 min;13 000 r·min^{-1} 离心 10 min,弃上清,重复以上步骤 4 次;向沉淀中加入 250 μL 提取液 A[50%正丙醇,80 mmol·L^{-1} Tris-HCl(pH=8.0),1.0%的二硫苏糖醇],水浴 30 min 后 13 000 r·min^{-1} 离心 10 min,取上清液;加入 250 μL 提取液 B[50%正丙醇,80 mmol·L^{-1} Tris-HCl(pH=8.0),1.4%的 4-乙烯基吡啶],水浴 30 min,13 000 r·min^{-1} 离心 10 min,上清液转移至新离心管,即麦谷蛋白样品。

1.2.2　RP-UPLC 分离麦谷蛋白

参考 Yu 等[18]的方法使用超高效液相色谱仪(Infinity 1290,Agilent,USA)分离麦谷蛋白并进行数据处理。取 1.2.1 获得的上清液 300 μL,加入 1 200 μL 预冷的丙酮,置于-20 ℃冰箱 12 h,13 000 r·min^{-1} 离心 10 min,弃上清,用无水乙醇洗涤沉淀两次,晾干沉淀;加入 600 μL 溶解液(49.96%乙腈,49.96%水,0.08%三氟乙酸),65 ℃水浴 2 h 使白色的麦谷蛋白固体充分溶解,过 0.45 μm 尼龙滤膜后装入液相瓶。

使用 ZORBAX SB-C18 色谱柱(5 μm,4.6×

150 mm，Agilent，USA），流动相 A 为含 0.08% 三氟乙酸的超纯水，流动相 B 为含 0.08% 三氟乙酸的乙腈溶液，流动相经双层滤纸过滤并超声除气后使用。初始程序为 79% 的流动相 A 和 21% 的流动相 B 洗脱 5 min，从第 6 min 到第 25 min，流动相 A 逐渐降低至 53%，流动相 B 逐渐增加至 47%，最后以 53% 的流动相 A 和 47% 的流动相 B 洗脱 5 min，共计 30 min。柱温 40 ℃，流速 0.5 mL·min^{-1}，进样量 15 μL，检测波长 210 nm。

设置不同参数以确定最佳分离条件，流动相比例（A∶B）分别为 53∶47、52∶48、51∶49、50∶50、49∶51 和 48∶52，洗脱时间分别 20、25、30、35、40 和 45 min，柱温 35、40、45、50、55 和 60 ℃，流速 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 和 1.0 mL·min^{-1}，进样量 10、12、14、16、18 和 20 μL。采用以下公式计算单个 HMW-GS 相对含量和 H/L：单 HMW-GS 相对含量＝单 HMW-GS 峰面积/总 HMW-GS 峰面积×100%。

H/L＝HMW-GS 峰面积/LMW-GS 峰面积×100%。

1.2.3 SDS-PAGE 分离麦谷蛋白

参考于利伟等[20]的方法利用 SDS-PAGE 分离麦谷蛋白。取 1.2.1 获得的上清液 50 μL，加入 50 μL 上样缓冲液[80 mmol·L^{-1} 的 Tris-HCl（pH＝8.0），20% 甘油，0.069 mol·L^{-1} 的 SDS，0.02% 溴酚蓝染液]。使用单垂直电泳仪（DYCZ-22A，六一，北京），用 4% 的浓缩胶[1.77 mL 40% 丙烯酰胺，0.96 mL 2% 甲叉丙烯酰胺，2.25 mL 1 mol·L^{-1} Tris-HCl（pH＝6.8），180 μL 10% SDS，12.69 mL 蒸馏水，15 μL TEMED 和 150 μL 10% 过硫酸铵]和 10% 的分离胶[12.4 mL 40% 丙烯酰胺，6.75 mL 2% 甲叉丙烯酰胺，6.39 mL 4 mol·L^{-1} Tris-HCl（pH＝8.8），507 μL 10% SDS，24.45 mL 蒸馏水，13 μL TEMED 和 130 μL 10% 过硫酸铵]分离麦谷蛋白亚基，上样量 6.5 μL，电压 260 V，电流 60 mA，电泳 3.5 h 后将凝胶置于染色液（10% 冰醋酸，40% 甲醇，0.05% 考马斯亮蓝 R250）中染色 1 h，然后用脱色液（10% 冰醋酸，40% 甲醇）脱色约 12 h，用凝胶成像仪进行拍照。

1.3 数据处理

使用 Excel 2016 处理数据，用 SPSS 19.0 分析差异显著性。

2 结果与分析

2.1 RP-UPLC 分离麦谷蛋白方法的优化

2.1.1 流动相比例对分离效果的影响

流动相比例是影响分离效果的关键因素。随着流动相 B 比例的增加，峰高上升，出峰时间提前（图 1A）。当流动相 A∶B 为 53∶47 时，By8 亚基峰较低，很难与杂峰区分；继续提高流动相 B 的比例，By8 亚基峰升高，与杂峰区分度增加，流动相比例为 48∶52 时效果最优。

2.1.2 洗脱时间对分离效果的影响

洗脱时间是影响色谱分离的重要因素之一。随着洗脱时间的增加，出峰时间逐渐提高，图谱逐渐清晰（图 1B）。当洗脱时间为 35、40 和 45 min 时，图谱清晰，便于识别单个 HMW-GS 和定量分析，但分离时间过长会浪费流动相和检测器寿命。因此，最佳洗脱时间为 35 min。

2.1.3 柱温对分离效果的影响

柱温也是影响液相分离效果的重要因素。较高的温度可以缩短分离时间，但过高的温度会降低色谱柱的使用寿命甚至损坏色谱柱。当温度较低（35 ℃）时，By8 亚基和 Bx7 亚基无法有效分离；随着温度的增加，By8 亚基和 Bx7 亚基逐渐分开，当温度达到 55 ℃时，分离效果最佳；当温度进一步升高到 60 ℃时，By8 亚基和 Dx2 亚基无法完全分开。因此，最适宜的柱温为 55 ℃（图 2A）。

2.1.4 流速对分离效果的影响

流速也会影响液相的分离效果。当流速为 0.5 mL·min^{-1} 时，分离效果较好，谱图清晰；随着流速的增加，出峰时间提前，峰高降低，By8 亚基和 Bx7 亚基无法有效分离，图谱质量下降（图 2B）。因此，最适宜的流速为 0.5 mL·min^{-1}，既可以获得良好的图谱，还可以节约流动相。

2.1.5 进样量对分离效果的影响

进样量通常会影响液相图谱的峰高。随着进样量的增加，峰高逐渐增加。当进样量为 16 μL 时，最高峰约为 0.35 AU，谱图清晰；样品量过高会对色谱柱造成负担。因此，16 μL 是最适宜的进样量（图 2C）。综上，最优的洗脱程序为 79% 的流动相 A 和 21% 的流动相 B 洗脱 5 min，从第 6 min 到第 30 min，流动相 A 逐渐降低至 48%，流动相 B 逐渐增加至 52%，最后以 48% 的流动相 A 和 52% 的流动相 B 洗脱 5 min，共计 35 min，柱温 55 ℃，流速 0.5 mL·min^{-1}，进样量 16 μL。

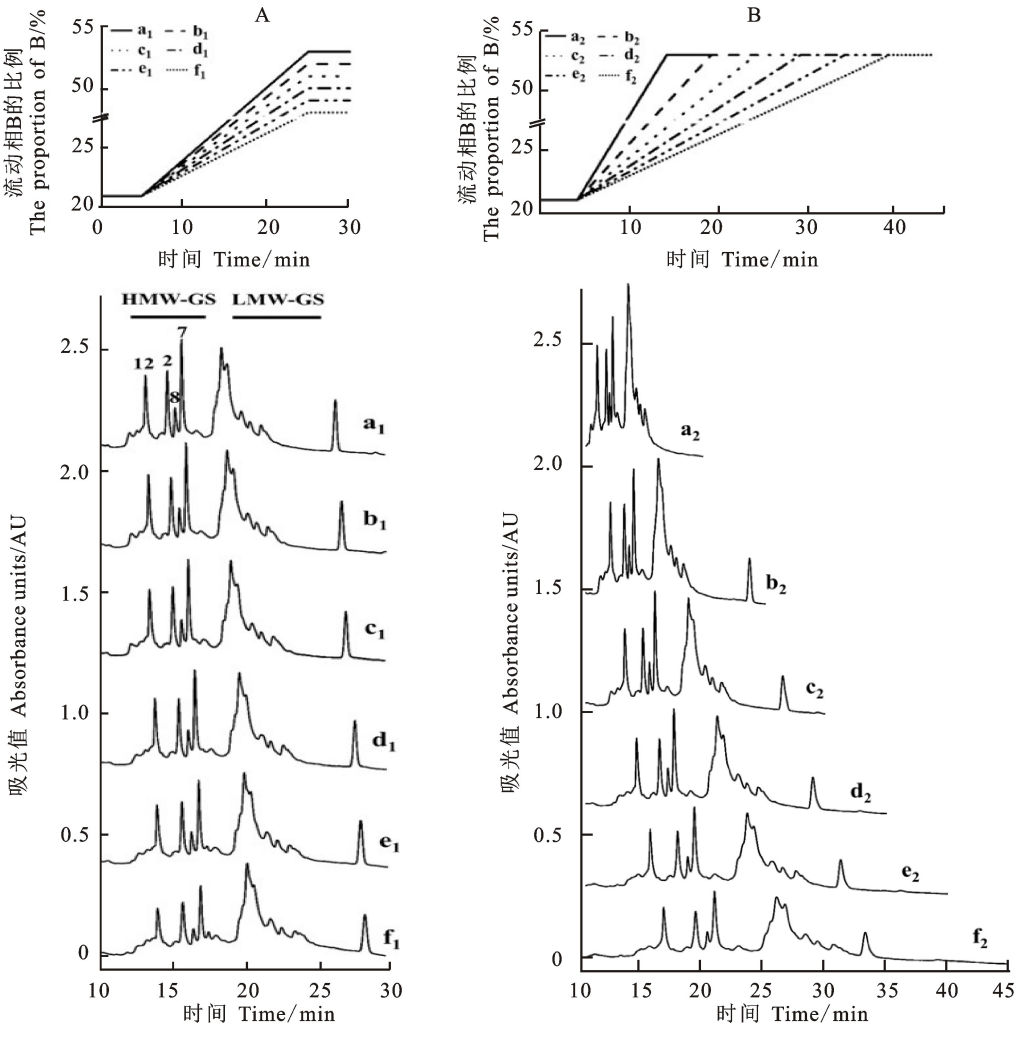


图 1　不同流动相比例(A)和洗脱时间(B)下中国春麦谷蛋白的分离图谱

Fig. 1　Chromatograms of glutenin from Chinese Spring at different elution solution ratios(A) and elution time(B)

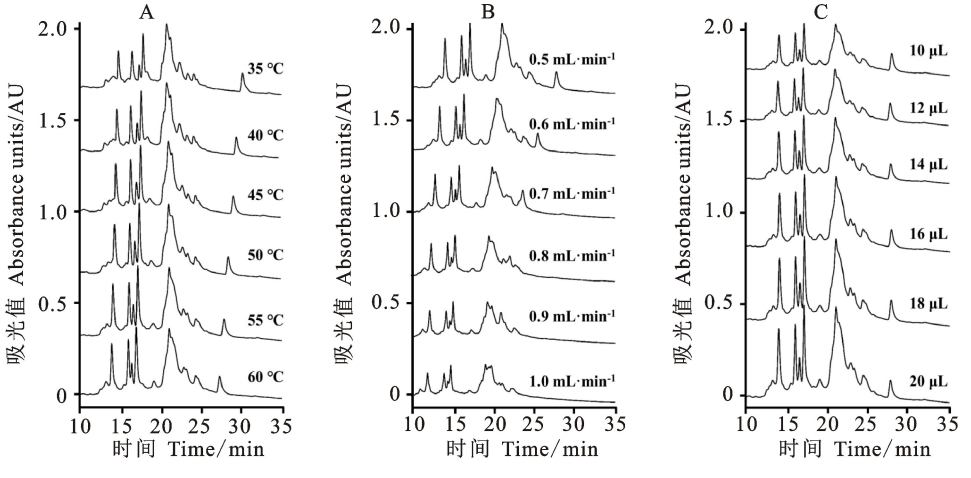


图 2　不同柱温(A)、流速(B)和进样量(C)下中国春麦谷蛋白的分离图谱

Fig. 2　Chromatograms of glutenin from Chinese Spring at different column temperatures(A), flow rates(B) and injection volumes(C)

2.1.6 新建立方法的重复性分析

为了验证新建麦谷蛋白提取方法的重复性，采用最优的程序对中国春的麦谷蛋白重复分离了三次，并将获得的图像进行了叠加，结果表明，三次重复之间差异较小，说明该方法的重复性较好（图 3A）。根据三次分离的结果计算单个 HMW-GS 的相对含量和 H/L，结果表明，Bx7 亚基的相对含量较高（33.71%），其次是 Dy12 和 Dx2（分别为 30.70%和 24.54%），By8 亚基的相对含量最低（11.05%）（图 3B）。

2.2 不同基因型小麦麦谷蛋白的分离与鉴定

利用 5 个不同基因型小麦品种（西农 979、西昌 69、济南 17、新麦 18 和新麦 26）验证新建方法分离小麦麦谷蛋白的可行性。采用 SDS-PAGE 对其麦谷蛋白组成进行鉴定的结果表明，5 个小麦品种均含有 5 个 HMW-GS，*Glu-A1* 位点上均为 Ax1，*Glu-B1* 位点上有三种变异（Bx7＋By8、Bx7＋By9 和 Bx17＋By18），*Glu-D1* 位点上也有三种变异（Dx2＋Dy12、Dx4＋Dy12 和 Dx5＋Dy10）（图 4A）。利用新建立的方法分离 5 个小麦品种的麦谷蛋白（图 4B），结果表明，上述 HMW-GS 亚基均被有效分离，说明该方法可行。定量分析结果（表 1）表明，品种对被测亚基相对含量有显著影响，5 个小麦品种的 Ax 亚基、Bx 亚基、By 亚基、Dx 亚基、Dy 亚基含量和 H/L 的变异范围分别为14.52%～19.55%、25.48%～

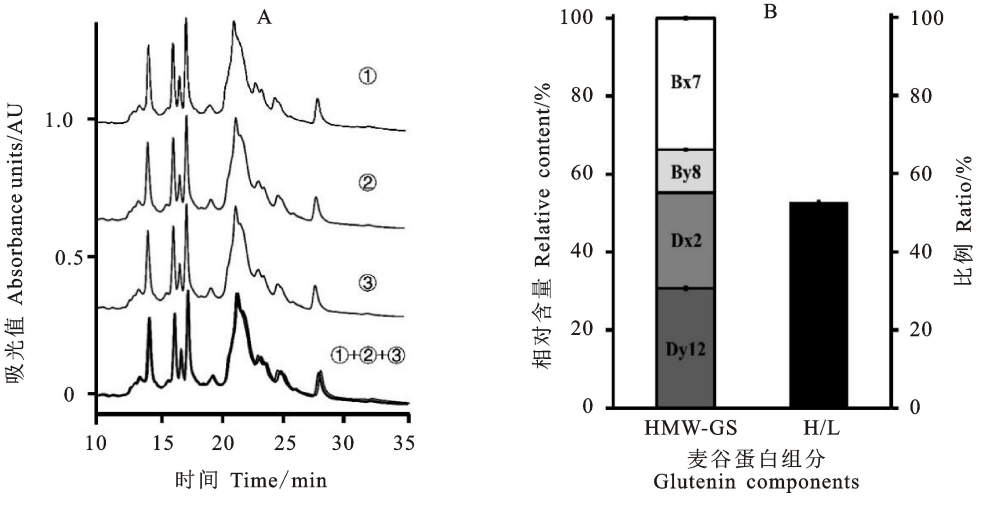


图 3 优化条件下 RP-UPLC 分离麦谷蛋白的重复性

Fig. 3 Reproducibility of RP-UPLC separation of glutenin under the optimized conditions

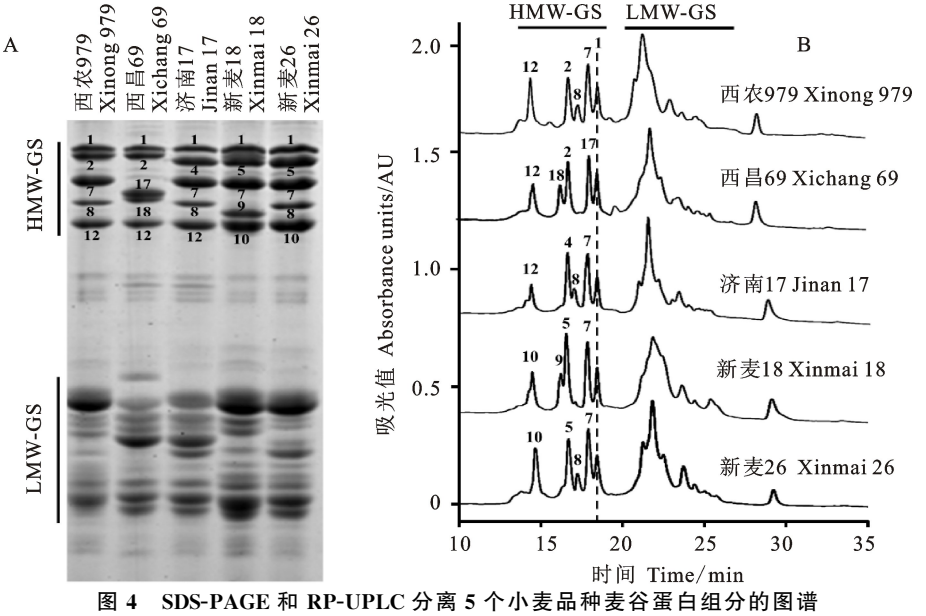


图 4 SDS-PAGE 和 RP-UPLC 分离 5 个小麦品种麦谷蛋白组分的图谱

Fig. 4 Images of glutenin components of the five wheat cultivars separated using SDS-PAGE(A) and RP-UPLC(B)

30.1%、10.58%～15.71%、22.50%～ 28.83%、14.83%～20.30%和 49.12%～ 62.20%,变异系数分别为 11.61%、6.69%、17.76%、11.84%、11.81%和 8.60%,说明基因型是影响麦谷蛋白组分的重要因素。

2.3 种植地点对麦谷蛋白组分的影响

定量分析河南省 8 个种植地点新麦 26 的麦谷蛋白组分,结果(表 2)表明,地点对被测亚基含量有显著效应,不同地点对不同亚基的效应不尽相同;Ax1 亚基、Bx7 亚基、By8 亚基、Dx5 亚基、Dy10 亚基和 H/L 值的变化范围分别为 17.46%～ 19. 61%、25. 65% ～ 27. 66%、9. 95% ～ 11.75%、22.38%～24.59%、19.85%～22.33%和 59.09%～67.61%,说明生长环境会显著影响小麦籽粒麦谷蛋白的合成和积累。Ax1 亚基、Bx7 亚基、By8 亚基、Dx5 亚基、Dy10 亚基和 H/L 的变异系数分别为 4.58%、2.64%、5.98%、3.50%、4.23%和 4.74%,明显小于 5 个小麦品种的变异系数,说明环境对小麦籽粒麦谷蛋白组分的影响小于基因型。

表 1　5 个小麦品种的 HMW-GS 的相对含量和 HMW-GS 与 LMW-GS 的比值

Table 1　Glutenin components of individual HMW-GS and ratio of HMW-GS to LMW-GS in the five wheat cultivars　　%

品种 Variety	Ax 亚基 Ax subunit	Bx 亚基 Bx subunit	By 亚基 By subunit	Dx 亚基 Dx subunit	Dy 亚基 Dy subunit	HMW-GS/LMW-GS
西农 979 Xinong 979	19.55±0.23a	28.23±0.19b	11.02±0.18c	22.50±0.10c	18.70±0.32b	54.35±0.21c
西昌 69 Xichang 69	17.16±0.15c	26.05±0.33c	15.71±0.08a	24.95±0.30b	16.62±0.30c	54.44±0.33c
济南 17 Jinan 17	15.79±0.30d	30.10±0.74a	10.58±0.24c	28.70±0.61a	14.83±0.67d	57.26±0.12b
新麦 18 Xinmai 18	14.52±0.22e	25.48±0.02c	12.72±0.48b	28.83±0.07a	18.46±0.35b	49.12±0.83d
新麦 26 Xinmai 26	18.23±0.42b	27.71±0.53b	10.75±0.73c	23.01±0.99bc	20.30±0.15a	62.20±0.37a
范围 Range	14.52～19.55	25.48～30.10	10.58～15.71	22.50～28.83	14.83～20.30	49.12～62.20
均值 Average	17.05	27.51	12.16	25.60	17.78	55.47
标准差 SD	1.98	1.84	2.16	3.03	2.10	4.77
变异系数 CV	11.61	6.69	17.76	11.84	11.81	8.60

同列数据后不同字母表示不同品种间差异显著($P<0.05$)。下同。

Values followed by different letters in same column are significantly different between different varieties at 0.05 level. The same in table 2.

表 2　不同地点新麦 26 的 HMW-GS 相对含量和 HMW-GS 与 LMW-GS 的比值

Table 2　Glutenin components of individual HMW-GS and ratio of HMW-GS to LMW-GS in the wheat cultivar Xinmai 26 at different locations　　%

地点 Location	Ax1 亚基 Ax1 subunit	Bx7 亚基 Bx7 subunit	By8 亚基 By8 subunit	Dx5 亚基 Dx5 subunit	Dy10 亚基 Dy10 subunit	HMW-GS/LMW-GS
辉县市 Huixian	18.03±0.01b	27.66±0.31a	9.95±0.33c	23.52±0.08bc	20.83±0.09cd	60.29±0.84ef
新乡县 Xinxiang	19.37±0.04a	26.54±0.47ab	10.45±0.26c	23.80±0.31b	19.85±0.14e	63.00±0.50cd
获嘉县 Huojia	19.70±0.48a	26.20±0.21ab	10.73±0.18bc	23.08±0.05c	20.29±0.03de	61.25±0.09de
长葛市 Changge	17.46±0.15b	26.35±0.23ab	10.08±0.12c	24.59±0.02a	21.52±0.22b	60.09±0.41ef
襄城县 Xiangcheng	19.16±0.12a	25.65±0.71c	11.56±0.17ab	22.28±0.05d	21.34±0.37bc	59.09±0.36f
南乐县 Nanle	19.61±0.16a	26.37±0.13ab	11.75±0.07a	22.38±0.37d	19.88±0.32e	67.61±0.86a
巩义市 Gongyi	17.90±0.53b	26.12±0.01ab	10.46±0.52c	23.19±0.11bc	22.33±0.12a	63.83±0.48bc
浚县 Xunxian	19.06±0.16a	27.56±0.07a	10.68±0.08c	22.38±0.13d	20.32±0.04de	65.61±0.43b
变异范围 Range	17.46～19.61	25.65～27.66	9.95～11.75	22.38～24.59	19.85～22.33	59.09～67.61
均值 Average	18.79	26.56	10.71	23.15	20.80	62.60
标准差 SD	0.86	0.70	0.64	0.81	0.88	2.97
变异系数 CV	4.58	2.64	5.98	3.50	4.23	4.74

3 讨 论

3.1 影响 RP-UPLC 分离效果的因素

流动相比例、洗脱时间、柱温、流速和进样量是影响 RP-UPLC 分离结果的关键因素。本研究参考 Yu 等[18]的方法，首先设定流动相 A 和流动相 B 的比值为 53∶47，结果发现，By8 亚基峰较低，很难与杂峰区分，降低流动相 A 的比例，当流动相 A 与 B 的比值为 48∶52 时图像分辨率较高，这一洗脱比例在之前的研究中未见报道。随着洗脱时间的增加，出峰时间逐渐延迟，峰高降低，麦谷蛋白图谱逐渐清晰；随着柱温的升高，出峰时间略有所下降，峰高升高；随着流速的升高，出峰时间下降，峰高降低，这些都与 Yu 等[18]的研究结果一致。进样量通常会影响峰高，随着进样体积的增加，峰高逐渐增加，这与杨 璐[21]关于 RP-HPLC 的研究结果一致。本研究的最优洗脱程序与 Lee 等[17]和 Yu 等[18]报道的程序不完全相同，这可能与样品、操作、仪器和色谱柱的型号有关。

RP-UPLC 和 RP-HPLC 分离麦谷蛋白亚基的原理相似，都是根据亚基亲水性的强弱对其进行区分，HMW-GS 的亲水性比 LMW-GS 强，因此首先被洗脱出来，出峰时间较短。本研究利用 RP-UPLC 分离鉴定了 11 种 HMW-GS（Ax1、Bx7、Bx17、By8、By9、By18、Dx2、Dx4、Dx5、Dy10 和 Dy12），其中 Dy 亚基亲水性最强，出峰时间较短，随后是 By、Dx 和 Bx，Ax 亚基的亲水性最弱，出峰时间最长，中国春、济南 17 和新麦 26 中的 By8 亚基的出峰时间在 Dx 之后，这与 Jang 等[12]用 RP-HPLC 的研究结果一致，可能是由于 By8 亚基的亲水性远小于 By9 和 By18。通常同类型亚基具有相似的理化性质，因此 Dy10 和 Dy12、By18 和 By9、Dx2、Dx4 和 Dx5、Bx7 和 Bx17 的出峰时间相近，在液相图谱上很难鉴别，因此在用 RP-UPLC 定量分析麦谷蛋白组分之前仍需使用 SDS-PAGE 鉴定麦谷蛋白的组成[12,17]。

3.2 RP-UPLC 定量分析麦谷蛋白组分在小麦品质研究中的应用

麦谷蛋白是影响面团强度和加工特性的重要因素，HMW-GS 只占小麦贮藏蛋白的 12%左右，但解释了面筋结构和面团品质特性变异的 45%～70%[3-4,6]。新麦 26 是我国首批认定的 4 个超强筋小麦品种之一，面团形成时间和稳定时间分别达 22 min 和 31 min，是其亲本的 3～4 倍[22-23]。本研究发现，新麦 26 的 HMW-GS 组成为 Ax1、Bx7＋By8 和 Dx5＋Dy10，聚合了亲本的优质亚基（图 4），这是其面团强度显著高于亲本的主要原因。在分子尺度上，HMW-GS 形成面筋的“弹性骨架”，LMW-GS 通过二硫键作为分支连接到该骨架上[24]。H/L 反映了 HMW-GS 与 LMW-GS 的相对含量，H/L 越高，HMW-GS 的相对含量就越高，面筋结构越稳定，新麦 26 的 H/L 显著高于其他品种。本研究建立的方法可以定量分析小麦材料（包括小麦品种、诱变系、异附加系、单亚基缺失系等）的麦谷蛋白组分，进而解析其品质形成机制，为小麦育种提供参考。

本研究发现，种植地点会显著影响小麦单个 HMW-GS 的相对含量和 H/L。Yu 等[18]和 Moloi 等[25]也发现了类似的现象。这说明种植环境可能通过影响麦谷蛋白的组分影响小麦品质。H/L 已被证明与面团的流变学特性呈正相关[6]，南乐县的 H/L 最大（67.61%），其次是浚县（65.61%），这预示南乐县和浚县种植的新麦 26 的品质较优。本研究还发现，8 个种植地点新麦 26 的单个 HMW-GS 含量和 H/L 的变异系数小于 5 个品种的变异系数，赵石磊等[26]发现，34 个种植地点的蛋白质含量、湿面筋含量、面筋指数、面团形成时间、面团稳定时间等品质参数的变异系数小于 15 个基因型的变异系数，说明环境对小麦品质特性的影响小于基因型。本研究建立的方法可以用于探究小麦品质的影响机制，为品种的合理布局提供科学依据。

参考文献：

[1]何中虎，庄巧生，程顺和，等. 中国小麦产业发展与科技进步[J]. 农学学报，2018，8(1)：108.
HE Z H，ZHUANG Q S，CHENG S H，*et al*. Wheat production and technology improvement in China [J]. *Journal of Agriculture*，2018，8(1)：108.

[2] GOESAERT H，BRIJS K，VERAVERBEKE W S，*et al*. Wheat flour constituents：How they impact bread quality，and how to impact their functionality [J]. *Trends in Food Science & Technology*，2005，16(1-3)：18.

[3] LI X，LIU T，SONG L，*et al*. Influence of high-molecular-weight glutenin subunit composition at *Glu-A1* and *Glu-D1* loci on secondary and micro structures of gluten in wheat(*Triticum aestivum* L.) [J]. *Food Chemistry*，2016，213：728.

[4]LI S，LIU Y，TONG J，*et al*. The overexpression of high-molecular-weight glutenin subunit Bx7 improves the dough rheological properties by altering secondary and micro-structures of wheat gluten [J]. *Food Research International*，2020，130：108914.

[5]朱保磊.河南小麦品种的品质状况及其与 LMW-GS 基因间的关系[D].郑州:河南农业大学,2017.
ZHU B L. Quality performance of wheat varieties in Henan Province and their relationship with the LMW-GS genes [D]. Zhengzhou:Henan Agricultural University,2017.

[6]张平平,张岐军,刘 丽,等. *Glu-B1* 位点亚基色谱鉴定及 7^{OE} 对面团强度的影响[J].作物学报,2007,33(10):1578.
ZHANG P P,ZHANG Q J,LIU L,*et al*. Identification of HWM-GS in *Glu-B1* Loci by HPLC and the effects of 7^{OE} on wheat dough strength [J]. *Acta Agronomica Sinica*,2007,33(10):1578.

[7]李春燕,张翠绵,柴建芳,等.分离小麦麦谷蛋白亚基的几个关键因素研究[J].华北农学报,2019,34(4):32.
LI C Y,ZHANG C M,CHAI J F,*et al*. Several key factors for isolating the glutenin subunits of wheat [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*,2019,34(4):32.

[8]赵贝贝,耿曼璐,戚浩彧,等.小麦贮藏蛋白的液相色谱分析研究[J].粮食与饲料工业,2015(10):65.
ZHAO B B,GENG M L,QI H Y,*et al*. Analysis of wheat gluten protein by high performance liquid chromatography [J]. *Cereal and Feed Industry*,2015(10):65.

[9]BEAN S R,LOOKHART G L. High-performance capillary electrophoresis of meat,dairy and cereal proteins [J]. *Electrophoresis*,2001,22:4210.

[10]高 璇,高利艳,晏月明.小麦籽粒谷蛋白提取方法的优化与双向电泳分析[J].麦类作物学报,2008,28(6):971.
GAO X,GAO L Y,YAN Y M. Optimization of extraction method of wheat grain glutenins and two-dimensional electrophoretic analysis [J]. *Journal of Triticeae Crops*,2008,28(6):971.

[11]ZHANG Q,DONG Y,AN X,*et al*. Characterization of HMW glutenin subunits in common wheat and related species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry(MALDI-TOF-MS) [J]. *Journal of Cereal Science*,2008,47:252.

[12]JANG Y R,BEOM H R,ALTENBACH S B,*et al*. Improved method for reliable HMW-GS identification by RP-HPLC and SDS-PAGE in common wheat cultivars [J]. *Molecules*,2017,22:1055.

[13]ZHOU J H,ZHAO J,YUAN H C,*et al*. Comparison of UPLC and HPLC for determination of trans-10-hydroxy- 2-decenoicacid content in royal jelly by ultrasound-assisted extraction with internal standard [J]. *Chromatographia*,2007,66:185.

[14]FEKETE S,FEKETE J,GANZLER K. Validated UPLC method for the fast and sensitive determination of steroid residues in support of cleaning validation in formulation area [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*,2008,49:833.

[15]蔡灿军,郭志雄,潘腾飞,等.应用 UPLC 分析荔枝果皮、假种皮可溶性糖和有机酸组分的变化[J].中国农学通报,2021,37(31):139.
CAI C J,GUO Z X,PAN T F,*et al*. Analysis of soluble sugars and organic acids in litchi pericarp and aril by UPLC [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*,2021,37(31):139.

[16]覃艳虹,江 旻,张 彤,等.UPLC 法同时测定双黄升白复方中 11 种成分[J].中成药,2022,44(1):28.
QIN Y H,JIANG M,ZHANG T,*et al*. Simultaneous determination of eleven constituents in Shuanghuang Shengbai Formula by UPLC [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*,2022,44(1):28.

[17]LEE S B,YANG Y J,LIM S H,*et al*. A rapid,reliable RP-UPLC method for large-scale analysis of wheat HMW-GS alleles [J]. *Molecules*,2021,26:6174.

[18]YU Z,HAN C,YAN X,*et al*. Rapid characterization of wheat low molecular weight glutenin subunits by ultraperformance liquid chromatography(UPLC) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,2013,61:4026.

[19]李少鹏.花后叶面喷施尿素对小麦面团品质的影响[D].杨凌:西北农林科技大学,2020.
LI S P. Effect of folic spraying urea on the quality of wheat dough after anthesis [D]. Yangling:Northwest A&F University,2020.

[20]于利伟,陈爱艳,郭 雷,等.小麦西昌 69 的 EMS 诱变系蛋白品质变异分析及种质筛选[J].麦类作物学报,2020,40(2):155.
YU L W,CHEN A Y,GUO L,*et al*. Study on protein quality variations and selection of germplasm of EMS mutation lines from wheat Xichang 69 [J]. *Journal of Triticeae Crops*,2020,40(2):155.

[21]杨 璐.簇毛麦储藏蛋白鉴定与染色体定位[D].杨凌:西北农林科技大学,2020.
YANG L. Study on identification and chromosome location of *Dasypyrum villosum* storage protein [D]. Yangling:Northwest A&F University,2020.

[22]杨丽娟,董 昀,盛 坤,等.超强筋小麦新品种新麦 26 籽粒灌浆特性研究[J].河南农业科学,2011,40(11):35.
YANG L J,DONG Y,SHENG K,*et al*. Grain filling characteristics of new strong gluten wheat cultivar Xinmai26 [J]. *Journal of Henan Agricultural Science*,2011,40(11):35.

[23]江 雪.基于双向电泳技术分的小麦强筋品质相关蛋白[D].郑州:郑州大学,2017.
JIANG X. Isolation and identification of proteins involved in quality of the strong-gluten wheat by two-dimensional electrophoresis [D]. Zhengzhou:Zhengzhou University,2017.

[24]HU X,CHENG L,HONG Y,*et al*. An extensive review:How starch and gluten impact dough machinability and resultant bread qualities [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*,2021,196:9535.

[25]MOLOI M J,BILJON A V,LABUSCHAGENE M T,*et al*. Effect of quantity of HMW-GS 1Ax1,1Bx13,1By16,1Dx5 and 1Dy10 on baking quality in different genetic backgrounds and environments [J]. *LWT-Food Science and Technology*,2017,78:160.

[26]赵石磊,雷振生,林作楫,等.环境条件与基因型对面包烘烤品质及相关流变学特性的影响[J].华北农学报,2011,26(2):230.
ZHAO S L,LEI Z S,LIN Z J,*et al*. Effects of different environment and genotype on bread baking quality and the correlated dough properties [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*,2011,26(2):230.