

烟草 FI 蛋白纯化、鉴定及营养安全性研究

王胜优^{1,2}, 李美宏¹, 胡湘洲¹, 姚时舫¹, 罗钰嘉¹, 谭艾娟^{1*}

(1. 贵州大学生命科学学院/农业生物工程研究院/山地植物资源保护与保护种质创新教育部重点实验室/山地生态与农业生物工程协同创新中心, 贵阳 550025; 2. 贵州省烟草科学研究所, 贵阳 550003)

摘要:应用葡聚糖凝胶层析法对烟草 FI 蛋白进行纯化, 通过 SDS-PAGE、PAGE 电泳进行组分鉴定及质谱分析, 并对 FI 蛋白进行小鼠限量试验。结果表明: (1) 通过热沉法得到 FI 粗蛋白, 经过凝胶层析法分离收集到 3 个组分。在凝胶电泳图中, 明确组分 1 有两个亚基, 分别为 55、13.6 kD, 经过与标准品对比确定组分 1 为 FI 蛋白。(2) 质谱分析结果中 FI 蛋白含有 20 种氨基酸及人体 8 种必需氨基酸, 且已达到 FAO/WHO 的优质蛋白评分标准。(3) 限量试验表明 FI 蛋白对小鼠的临床行为学、体重、脏器系数均影响不显著 ($P>0.05$), 说明 FI 蛋白对小鼠生长发育和健康没有抑制作用, 属于基本无毒。本试验通过蛋白质谱对 FI 蛋白的氨基酸组成进行评估分析及小鼠限量试验, 明确了 FI 蛋白的营养价值及食用安全性, 为烟草 FI 蛋白的多用途开发利用提供理论依据。

关键词: RuBisCO; SDS-PAGE; 质谱; 氨基酸分析; 限量试验

中图分类号: TS41.1

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2023)02-0135-06

Study on the Tobacco FI Protein Purification, Identification and Nutritional Safety

WANG Shengyou^{1,2}, LI Meihong¹, HU Xiangzhou¹, YAO Shiyi¹, LUO Yujia¹, TAN Aijuan^{1*}

(1. College of Life Sciences, Guizhou University/Institute of Agro-bioengineering, Guizhou University/Key laboratory of Plant Resource Conservation and Germplasm Innovation in Mountainous Region (Ministry of Education)/Collaborative Innovation Center for Mountain Ecology & Agro-Bioengineering (CICMEAB), Guiyang 550025; 2. Guizhou Tobacco Research Institute, Guiyang 550003, China)

Abstract: Tobacco FI protein was purified by dextran gel chromatography, component identification and mass spectrometry were performed by SDS-PAGE and PAGE electrophoresis, and FI protein was subjected to mouse limit test. The results showed that: (1) FI crude protein was obtained by heat sink method, and 3 components were separated and collected by gel chromatography. In the gel electrophoresis diagram, it is clear that component 1 has two subunits, 55 kD and 13.6 kD, respectively. After comparing with the standard, it is determined that component 1 is FI protein. (2) In the results of mass spectrometry analysis, the FI protein contains 20 amino acids and 8 essential amino acids for the human body, and it has reached the FAO/WHO high-quality protein scoring standard. (3) Limited experiments showed that FI protein had no significant effect on the clinical behavior, body weight and organ coefficient of mice ($P>0.05$), indicating that FI protein had no inhibitory effect on the growth and health of mice, and it was basically non-toxic. In this experiment, the amino acid composition of FI protein was evaluated and analyzed through protein profile and mouse limit test, which clarified the nutritional value and food safety of FI protein, and provided a theoretical basis for the multi-purpose development and utilization of tobacco FI protein.

Key words: Rubisco; SDS-PAGE; Mass spectrometry; Amino acid analysis; Limited experiment

烟草是茄科烟草属植物^[1]。烟叶各成分中尤

以蛋白质含量最为丰富, 白肋烟中的蛋白含量甚至高达 20.48%^[2]。烟草 FI 蛋白占烟草可溶性蛋白含量的一半, 其他可溶性蛋白统称为 FII 蛋白(组分 2)。FI 全称为 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/氧化酶(RuBisCO), 主要存在于叶绿体中, 是植物光合作用时固定 CO₂ 的关键酶^[3]。植物中的 FI 一般由

收稿日期: 2020-04-03

基金项目: 中国烟草总公司贵州省公司科技专项(201852010064014)

作者简介: 王胜优(1994-), 女, 硕士, 从事蛋白分离纯化研究。

通讯作者: 谭艾娟, 女, 硕士, 教授, E-mail: 2939852335@qq.com

8个大亚基(LSU)和8个小亚基(SSU)组成,其中大亚基的分子量为50~55 kD,小亚基为12~18 kD^[4],完整分子量为520~550 kD。FI蛋白具有耐热性,50℃保温20 min能达到最大活力。烟草FI不仅具有较高的营养价值,且含有宝贵的硒元素,如今我国卫计委已经批准烟草硒蛋白作为添加剂制作食品和医药保健品。我国对烟叶蛋白研究起步较晚,国内对于FI蛋白的氨基酸含量分析报道较少,对FI蛋白的安全性研究目前未见报道,仅对沉淀pH及离子强度对FI结晶影响做了相关研究^[5-6]。本研究为减少工艺操作的复杂性,降低成本,针对FI蛋白耐热性使用热沉法分离蛋白,采用凝胶层析法进行纯化,对纯化所得FI蛋白进行鉴定、营养价值评价及安全性试验,以期对FI蛋白的开发利用价值进行评估。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

云烟87(旺长期烟叶,2019年贵州产,由贵州省烟草科学研究所提供,蛋白质含量3.75%),洗净,液氮速冻,-80℃储藏。

试验动物:SPF级昆明种小鼠,雌雄各半,体重(23±2)g,由中国人民解放军陆军军医大学提供,许可证SCXK(军)2012-0011。雌雄分笼在室温为(22±2)℃,相对湿度在40%~60%的条件下适应性饲养3 d,灌胃前禁食不禁水^[7]。

1.2 主要药品试剂

NaOH、HCl、Tris、Na₂HPO₄、NaH₂PO₄、NaCl、甘氨酸、甲醇、冰醋酸均为国产分析纯(天津市科密欧化学试剂有限公司);Sephadex G-200(索莱宝生物科技有限公司);FI标准蛋白(武汉华美生物工程公司,来源于菠菜,纯度>95%);SDS-PAGE低分子量蛋白Marker(源叶生物科技有限公司);二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、Trypsin酶(宝日医生物技术有限公司)。

1.3 主要仪器设备

湘仪离心机(湖南湘仪试验仪器开发有限公司);电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);pHS-3C型pH计(上海精密科学仪器有限公司);多功能胶体磨:JM-L80(温州昊星机械设备制造有限公司);真空冷冻干燥机(上海皓庄仪器有限公司);721N可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)等。

1.4 试验方法及条件

1.4.1 FI的粗提取

新鲜烟草→加入碱液匀浆、浸提(0~4℃)→滤布

过滤→硅藻土脱色除杂→热沉→离心→粗蛋白

称取100 g烟草叶片,加入预冷10倍液料比提取液(0.05 mol/L磷酸缓冲液pH 7.8、1.1% PVP,0.01 mol/L亚硫酸钠),匀浆后静置40 min,120目滤布过滤,滤液用硅藻土抽滤脱色除杂。将脱色后的滤液置于恒温水浴锅中50℃保温20 min,冰浴降至室温后以3 000 r/min的转速离心25 min,沉淀即为粗蛋白。

1.4.2 FI的纯化

烟草粗蛋白→沉淀复溶→凝胶层析柱(固定相预处理→装柱→平衡→上样→洗脱)→检测蛋白→绘出洗脱曲线→合并收集各组分蛋白→冷冻干燥浓缩→蛋白鉴定

凝胶填料经预处理后装柱,柱平衡和洗脱,平衡后取粗蛋白溶液,粗蛋白沉淀用0.05 mol/L pH 8.0的PBS缓冲液溶解后,缓缓加入层析柱,上样量5 mL。用超纯水洗脱,检测蛋白质280 nm吸光度值,绘出洗脱曲线。对各个洗脱组分进行收集并冷冻干燥浓缩,储存于-80℃冰箱。

1.4.3 氨基酸组分测定—蛋白质谱

将SDS-PAGE切胶回收,蛋白质的还原烷基化如下:加入终浓度10 mmol/L二硫苏糖醇(DTT)还原蛋白质,加入终浓度55 mmol/L碘乙酰胺(IAM),最后加入1 μg的Trypsin酶,过夜酶解8~16 h。酶解产生的多肽用C18柱子除盐,已经除盐的多肽抽干后用15 μL Loading Buffer(0.1%甲酸,3%乙腈)溶解多肽。多肽上LC-MS/MS(eksperTm-nanoLC;AB Sciex TripleTOF 5600-plus)仪器进行分析,上机条件参考王土连法^[8]并对结果进行评估。LC-MS/MS下机后,将原始下机数据直接提交到与AB SCIEX Triple TOF™ 5600 plus质谱仪连接的Protein Pilot软件中进行数据库检索。通过ProtParam软件对FI蛋白的氨基酸组分进行分析。

1.4.4 小鼠限量试验

试验组FI蛋白灌胃液:称取FI蛋白2 g加入100 mL超纯水配成溶液作为受试物,经口灌胃给予小鼠。

参照徐叔云等^[9]方法取小鼠20只,随机分为两组,每组10只,雌雄各半,一次经口给予0.22 mL/10 g,剂量为20.00 g/kg,连续观察14 d,试验组小鼠与对照组(灌胃等体积的生理盐水)比较。在第15天对所有小鼠颈椎脱臼处死,分离各主要脏器,剔除脂肪、筋膜,吸干脏器表面血液,胃去内容物洗净后用吸水纸吸去体液,称重并计算脏器系数^[10]。

1.4.5 数据处理

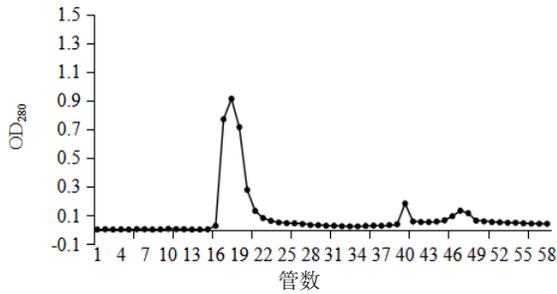
数据均采用“平均值±标准误”。采用SPSS 17

统计软件对数据进行处理。

2 结果与分析

2.1 葡聚糖凝胶层析纯化蛋白结果及 SDS-PAGE、PAGE 鉴定图

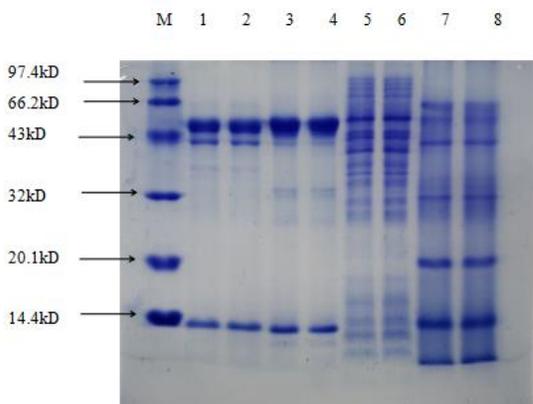
如图1所示,粗蛋白组分分离纯化效果较好,洗脱曲线有3个峰形,且3个峰间隔较大,尤其是峰1、峰2之间,说明该法得到的组分较为纯净。



注:层析柱径高 1.5 m×50 cm

图1 葡聚糖凝胶 G-200 洗脱曲线

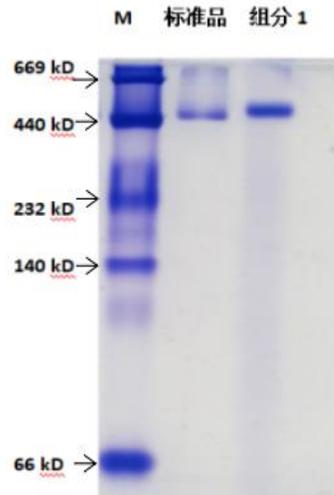
将经过 Sephadex G-200 纯化后收集的 3 个组分进行 SDS-PAGE 电泳,每个组分点样两次,结果如图 2 所示。与标准品对照,只有组分 1 的大、小亚基分子量与标准品相符,通过迁移率标准曲线计算得到组分 1 的大、小亚基分子量分别为 55、13.6 kDa,与标准品接近,确定其为 FI 蛋白。图中组分 1 的杂带较少且颜色较浅,说明试验纯化所得 FI 蛋白纯度高于标准品(纯度高于 95%),且组分 2、3 几乎没有 FI 蛋白的亚基条带,说明纯化效果较好。



注:M为低分子量蛋白质 Marker;1、2为 RuBisCO 标准品(来源于菠菜,纯度>95%);3、4为纯化的组分 1 样品;5、6为纯化的组分 2 样品;7、8为纯化的组分 3 样品

图2 纯化后的各组分 SDS-PAGE 电泳图谱

如图 3 所示,PAGE 凝胶电泳图谱中组分 1 和标准品均只有一个条带,经过与 Marker 的迁移率标准曲线测定,计算出组分 1 的蛋白分子量约为



注:M为超高分子量蛋白质 Marker;标准品为 FI 标准蛋白(来源于菠菜,纯度>95%);组分 1 为经过 Sephadex G-200 纯化得到的组分 1 样品

图3 组分 1 PAGE 电泳图谱

535 kDa,和标准品分子量 505 kDa 接近,因此可以确定组分 1 为 RuBisCO。而标准品分子量为 505 kDa,与试验所得蛋白及已知 Rubisco 分子量 550 kDa 均有差异,可能因为标准品来源于菠菜,大、小亚基有种属差异,所以蛋白分子量有所差别。

2.2 质谱分析

2.2.1 肽段二级图谱结果

GVMQILNTVIR 肽段二级谱图及肽段理论谱图分子离子峰质荷比(m/z)如图 4、图 5 所示。肽段 GVMQILNTVIR 是从小亚基覆盖率最高肽段选取,覆盖率为 68.33%。肽段裂解出现的序列特征离子主要有 6 种,当电荷保留在 N 端时,称为 a、b、c 系列离子,在 C 端时,称为 x、y、z 系列离子。每张二级谱图包含了被碎裂离子(子离子)的全部质量信息,被碎裂的离子叫作母离子,如果被碎裂的离子是一条肽段,则与之对应的二级谱图包含了这条肽段的详细信息。+1 价、+2 价、+3 价和 +4 价等代表的是母离子碎裂并生成二级谱图之前带有的电荷,通过对二级谱图进行母离子筛选、肽段的组装拼接等完成蛋白质谱鉴定。

2.2.2 FI 蛋白的氨基酸组分分析

通过 ProtParam 软件对 FI 蛋白的氨基酸组分进行分析,结果见表 1。FI 蛋白含有 20 种氨基酸,除甲硫氨酸与 FAO 持平外,其他必需氨基酸的含量远超联合国粮农组织(FAO)标准^[1],其中苏氨酸、缬氨酸、色氨酸甚至比水稻、大豆等作物的含量更高。联合国粮农组织/世界卫生组织(FAO/WHO)的蛋白评分模式指出,必需氨基酸(EAA)/总氨基酸(AA)的比值在 40% 左右为优质蛋白,FI

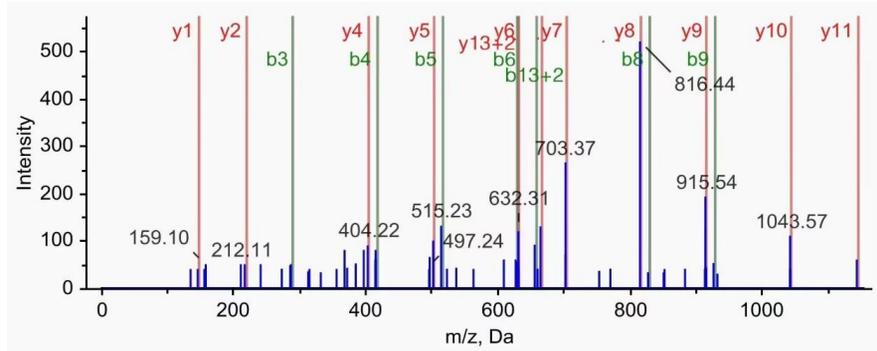


图4 GVMQILNTVIR 肽段二级谱图

Residue	b	b+2	y	y+2
D	116.0342	58.5207	1330.6849	665.8461
A	187.0713	94.0393	1215.6579	608.3326
T	288.1190	144.5631	1144.6208	572.8141
Q	416.1776	208.5924	1043.5732	522.2902
V	515.2460	258.1266	915.5146	458.2609
L	628.3301	314.6687	816.4462	408.7267
A	699.3672	350.1872	703.3621	352.1847
E	828.4098	414.7085	632.3250	316.6661
V	927.4782	464.2427	503.2624	252.1448
G	984.4997	492.7535	404.2140	202.6106

图5 GVMQILNTVIR 肽段理论谱图
分子离子峰质荷比(m/z)图

表1 FI蛋白的氨基酸组成

氨基酸	FI蛋白(%)	FAO	水稻	小麦	玉米	大豆
丙氨酸	9.1					
精氨酸	5.1					
天门冬酰胺	4.0					
天门冬氨酸	4.2					
半胱氨酸	2.0					
谷氨酰胺	4.1					
谷氨酸	7.7					
甘氨酸	7.6					
组氨酸	1.7					
异亮氨酸	4.4					
* 亮氨酸	8.9	4.8	8.2	7.0	15.0	7.6
* 赖氨酸	5.6	4.2	3.2	2.7	2.3	6.6
* 甲硫氨酸	2.2	2.2	3.0	2.5	3.1	1.1
* 苯丙氨酸	4.1	2.8	5.7	4.0	6.0	3.2
脯氨酸	5.0					
丝氨酸	5.9					
* 苏氨酸	5.2	2.8	3.8	3.3	3.7	3.9
* 色氨酸	2.2	1.4	1.3	1.2	0.6	1.2
* 酪氨酸	4.7	2.8	5.7	4.0	6.0	3.2
* 缬氨酸	7.8	4.2	6.2	4.3	5.3	5.2

注：“*”为必需氨基酸

蛋白值为40.7%，已达到优质蛋白标准。

2.3 小鼠限量试验

如表2所示，喂养小鼠14 d后，限量试验组雌性小鼠体重由(23.5±0.93)g增加到(27.9±1.40)g，平均增重4.4 g；试验组雄性小鼠体重由(24.6±0.93)g增加到(29.2±1.04)g，平均增重4.6 g。对照组雄性小鼠体重由(23.6±1.0)g增加到(28.0±2.10)g，平均增重4.4 g；对照组雌性小鼠体重由(23.0±0.38)g增加到(27.0±1.49)g，平均增重4.0 g。小鼠喂养7 d后，试验组雄性体重增重明显；小鼠喂养14 d后试验组雌性体重增重明显，说明FI蛋白对小鼠的生长没有起到抑制作用。雄性小鼠平均增重均高于雌性小鼠，原因可能是雄性小鼠新陈代谢比雌性小鼠快，肠胃消化吸收率较高。

由表3可知，灌胃14 d后对小白鼠进行解剖观察，同性别试验组和对照组的小鼠脏器比无明显性差异，各脏器与体重的比值等均在正常值范围内，同性别组间无显著性差异(P>0.05)。但无论是试验组还是对照组的雄性小白鼠脏器比重大多高于雌性小鼠，这可能是因为雄性小鼠自身新陈代谢速度比雌性小鼠快，试验起始体重也比雌性小鼠略高，因此脏器系数普遍高于雌性小鼠。

3 讨论

由蛋白层析图可看出只有两个杂峰，且峰1的面积远大于峰2、峰3，说明本试验根据FI蛋白的耐热特性使用热沉法沉淀粗蛋白，有效避免了其他杂蛋白的干扰。经过纯化后的蛋白在电泳图谱中表现出高于标准品的纯度，因为FI蛋白分子量约为550 kD，属于超高分子量蛋白，也能看出组分1、2间距大，根据凝胶层析原理可知两组分的蛋白分子量差距较大，所以本试验的凝胶层析法纯化工艺能达到较好的效果。在电泳图谱中组分1与标准品一致，但组分2、3出现较多条带，推测其为FII蛋白。已知FII蛋白为多种蛋白的总

表2 小鼠体重和行为变化观察记录结果

小鼠组别	性别	体重(g)				行为
		0 d	3 d	7 d	14 d	
试验组	♀	23.5±0.93	25.0±1.41	26.0±1.47	27.9±1.40	未见异常
	♂	24.6±0.93	26.0±1.41	28.2±1.47	29.2±1.04	
对照组	♀	23.0±0.38	24.0±0.68	26.0±0.71	27.0±1.49	未见异常
	♂	23.6±1.00	25.2±0.75	26.4±1.80	28.0±2.10	

注:与生理盐水比较, $P>0.05$,下同

表3 小鼠脏器系数

小鼠组别	性别	脏器系数(%)						
		心	肝	脾	肺	肾	胃	脑
试验组	♀	0.57 ± 0.05	4.54 ± 0.30	0.29 ± 0.04	0.71 ± 0.06	1.39 ± 0.05	0.82 ± 0.13	1.69 ± 0.20
	♂	0.61 ± 0.06	4.82 ± 0.38	0.27 ± 0.02	0.83 ± 0.14	1.48 ± 0.35	0.71 ± 0.06	1.54 ± 0.10
对照组	♀	0.54 ± 0.05	4.64 ± 0.51	0.25 ± 0.04	0.73 ± 0.09	1.29 ± 0.07	0.77 ± 0.11	1.64 ± 0.18
	♂	0.58 ± 0.30	5.02 ± 0.21	0.19 ± 0.21	0.79 ± 0.40	1.21 ± 0.82	0.61 ± 0.33	1.68 ± 0.76

称,在电泳图中可见FII蛋白主要以小分子量为主,分子量最小为9.4 kD左右。在理想状态下,每一张二级谱图对应一个肽段,峰的个数是母离子被进一步裂解后的碎片个数,但实际上所有的二级谱图都有非常多的峰,这是由于试验方法不同、设备误差和系统环境噪声等,会使谱图中引入额外不必要噪声峰导致的。

FI蛋白含有人体所需的全部8种必需氨基酸和10种非必需氨基酸,属于优质蛋白。谷氨酸含量高达7.7%,其金属螯合及质子供体能力有利于增强抗氧化活性,Kong等^[12]认为甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸的侧链基团、结构等有利于自由基的结合,从而提高抗氧化活性,FI蛋白中仅这3种氨基酸占比就高达24.5%,因此分析FI蛋白具有较高抗氧化活性。脯氨酸、谷氨酸作为维持蛋白热稳定性的重要蛋白,两种氨基酸含量高达12.7%,与报道的FI蛋白具有较高耐热性一致。但在对蛋白的氨基酸组成分析中发现本试验某些氨基酸含量低于Kung S D^[13]的结果,而有些氨基酸含量高于后者,与郭培国等^[14]得到的氨基酸含量也有差异,推测可能是因为Kung S D用于测定氨基酸含量的FI蛋白晶体纯度较高,且烟叶品种、生长环境等也会导致差异的产生,甚至是基因的改变,所以表达的氨基酸也会存在差异。

通过对蛋白质谱结果进行分析,发现FI蛋白具有较高的抗氧化活性,且具有一定耐热性,但这两种性质并未叠加,而是相互影响直至达到一种平衡状态,使FI蛋白具有独特性。抗氧化蛋白因为比抗氧化剂更加安全、环保,一直是研究热

点,但抗氧化蛋白普遍不耐热而未得到广泛应用,所以开发FI蛋白具有广阔的应用前景。在限量试验中小鼠一次经口给予灌胃剂量为20 g/kg,是限量试验剂量的4倍,小鼠的脏器系数也无显著差异($P>0.05$),说明FI蛋白没有产生急性毒性反应,且对小鼠生长发育无显著影响,属于基本无毒,可作为安全性食品或新型蛋白补充品开发利用。

据报道,FI蛋白的发泡性、乳化性均优于酪蛋白(牛奶的主要蛋白成分)。从营养价值和食品角度来评价,其氨基酸含量丰富且不含胆固醇,易于消化,特别适合作为老年人及肠胃病人的营养补充^[15]。高纯度FI蛋白为白色粉末,但在提取过程中,往往因为多酚类物质,尤其是与绿原酸的结合导致FI蛋白为微黄色,而这种结合是不可逆的,在后续研究中,将对去除多酚类物质进行试验,及对FI蛋白的分离纯化工艺进行优化,以期作为烟叶蛋白多用途开发利用提供理论依据。

中国作为烟草种植大国,其种植面积和产量均居世界第一,除用于卷烟生产外,大量烟叶因为无法充分开发利用而被舍弃,不仅导致大量资源浪费,且有环境污染的风险。深入研究与开发利用这种资源对于提高烟草的综合利用价值,为烟草行业去库存、稳种植、增加烟农收入,进而促进我国烟草行业可持续发展和产业结构调整均具有重要意义。

4 结 论

烟草FI蛋白含有全部必需氨基酸且符合FAO/WHO优质蛋白标准,在小鼠限量试验中一次经口灌胃限量试验剂量4倍的FI蛋白溶液,对小

鼠生长发育及脏器系数等无影响,表现为基本无毒,证实FI具有食用安全性。可见,烟草FI蛋白具有良好的开发利用前景。

参考文献:

- [1] 饶国华,赵谋明,林伟锋,等.中国低次烟叶资源综合利用研究[J].资源科学,2005(5):120-127.
- [2] 赵谋明,饶国华,林伟锋.烟草蛋白质研究进展[J].烟草科技,2005(4):31-34.
- [3] 何亚飞,李霞,谢寅峰. Rubisco 与 Rubisco 活化酶的分子机理研究进展[J].分子植物育种,2017,15(8):3295-3301.
- [4] 张启东,李鹏,柴国璧,等.烟叶蛋白研究进展[J].化学通报,2013,76(7):605-611.
- [5] 张劲松,高学云,黄镇,等.沉淀离子强度对烟草 Rubisco 结晶的影响[J].中国烟草科学,1997(3):3-7.
- [6] 张劲松,高学云,黄镇,等.沉淀 pH 值对烟草 Rubisco 结晶的影响[J].中国烟草科学,1997(2):3-7.
- [7] 中华人民共和国卫生部.中华人民共和国国家标准食品安全性毒理学评价程序和方法[S].北京:中国标准出版社,1995.
- [8] 王士连.蝇蛆耐高温抗氧化肽的发现及生物信息学分析[D].

广州:广州大学,2017.

- [9] 徐叔云,卞如濂,陈修,等.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2002:406.
- [10] 陈波利,谭艾娟,吕世明,等.蝉拟青霉提取液对小鼠的镇痛作用[J].动物医学进展,2019,40(11):63-67.
- [11] 龚洋洋,陆建学,黄艳青,等.南极磷虾粉氨基酸营养价值分析与评价[J].饲料工业,2013,34(16):38-41.
- [12] Kong B H, Peng X Y, Xiong Y L, et al. Protection of lung fibroblast MRC-5 cells against hydrogen peroxide-induced oxidative damage by 0.1-2.8kDa antioxidative peptides isolated from whey protein hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2012, 135(2): 540-547.
- [13] Kung S D, James A S, Tso T C, et al. Tobacco as a potential food source and smoke material: nutritional evaluation of tobacco leaf protein[J]. Journal of Food Science, 1980, 45: 320-322.
- [14] 郭培国,李荣华,陈建军.烟叶中FI蛋白的简便提取技术及其氨基酸成分分析[J].中国烟草学报,2000(2):17-21.
- [15] 栾倩倩.鲜烟叶中有效成分的分离纯化研究[D].大连:大连理工大学,2018.

(责任编辑:王昱)

(上接第121页)

- [5] Fang Y J, Xong L Z. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2015(4): 673-689.
- [6] 王 珊,王竹承.干旱胁迫对桔梗幼苗生长及生理特性的影响[J].西北农业学报,2014,23(7):160-165.
- [7] 桑子阳,马履一,陈发菊.干旱胁迫对红花玉兰幼苗生长和生理特性的影响[J].西北植物学报,2011,31(1):109-115.
- [8] 路其祥.干旱胁迫对蒲公英抗性生理生化指标的影响[D].邯郸:河北工程大学,2020.
- [9] 何倚剑.茄子种质资源遗传多样性与群体结构分析[D].南京:南京农业大学,2013.
- [10] 何启平,陈莹.校园常见植物叶绿素提取方法比较及其含量测定[J].黑龙江农业科学,2015(10):117-120.
- [11] 王伟玲,王展,王晶英.植物过氧化物酶活性测定方法优化[J].实验室研究与探索,2010,29(4):21-23.
- [12] 陈晓敏.测定切花中过氧化氢酶活性的3种常用方法的比较[J].热带农业科学,2002,22(5):13-16.
- [13] 王学奎.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2006:118-173.
- [14] 张爱民,杨红,耿广东.干旱胁迫对辣椒幼苗形态指标的影响[J].贵州农业科学,2011,39(10):54-56.
- [15] 刘朝霞,余焰文,陈艳秋,等.水分胁迫对苗期番茄叶片保护酶活性和植株形态的影响[J].北方园艺,2015(23):1-5.
- [16] 刘振威,孙丽,方婷婷,等.不同光质及组合对番茄幼苗生长及生理特性的影响[J].华北农学报,2015,30(5):141-145.

- [17] 孙晓东,贾娜,何鹏,等.干旱胁迫对陕北沙棘幼苗生长发育的影响[J].东北农业科学,2018,43(2):16-20.
- [18] 郭有燕,刘宏军,孔东升,等.干旱胁迫对黑果枸杞幼苗光合特性的影响[J].西北植物学报,2016,36(1):124-130.
- [19] 张婷华,杨再强,李永秀,等.水分胁迫对番茄叶片光合特性和叶绿素荧光参数的影响[J].灌溉排水学报,2013,32(6):72-76.
- [20] 徐卫平,蒋景龙,任绪明,等.低温胁迫对3种柑橘幼苗细胞膜及渗透调节的影响[J].分子植物育种,2017,15(3):1104-1108.
- [21] 靳月,李铁华,文仕知,等.干旱胁迫对闽楠幼苗的生长和生理特性的影响[J].中南林业科技大学学报,2018,38(9):50-57.
- [22] 路之娟,张永清,张楚.干旱胁迫对不同苦芥品种苗期生长和根系生理特征的影响[J].西北植物学报,2018,38(1):112-120.
- [23] 程艳,吴春燕,王娜,等.矮壮素基质浇灌法对番茄幼苗生长及理化指标的影响[J].东北农业科学,2018,43(6):40-43.
- [24] 李瑞姣,岳春雷,李贺鹏,等.干旱胁迫对日本莢蒾幼苗生理生化特性的影响[J].西北林学院学报,2018,33(2):56-61,103.
- [25] Jin Z P, Shen J J, Qiao Z J, et al. Hydrogen sulfide improves drought resistance in Arabidopsis thaliana[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011(3): 481-486.

(责任编辑:王昱)