

刺五加与短梗五加种子的蛋白质电泳分析

李晓琳¹, 张顺捷², 李颖¹, 孟黎明², 徐学良^{1,3}, 陈敏^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药资源中心, 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700;

2. 黑龙江省林副特产研究所, 黑龙江 牡丹江 157011;

3. 牡丹江师范学院 生命科学与技术学院, 黑龙江 牡丹江 157012)

[摘要] 目的:建立适用于刺五加和短梗五加种子的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴别方法,为二者种子的鉴别及质量评价提供参考。方法:采用15%分离胶的SDS-PAGE电泳对15个产地的刺五加种子和2个产地的短梗五加种子中可溶性蛋白进行电泳分析,利用BandScan 5.0软件对蛋白谱带蛋数目、谱带强度和相对分子质量等方面的差异进行比较。结果:17个种子样品共分离出31条清晰的蛋白谱带,其中2种种子的10条共有特征谱带和各自的1条标准特征谱带可作为刺五加和短梗五加种子的标准蛋白图谱。不同产地的刺五加种子蛋白电泳图谱具有一定的种内差异性。结论:该电泳方法和标准蛋白图谱可作为刺五加及短梗五加种子的鉴别依据。

[关键词] 刺五加; 短梗五加; 蛋白质; 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 电泳图谱

[中图分类号] R282.5;R284.1;R284.2;R282.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)22-0180-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015220180

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151022.1409.032.html>

[网络出版时间] 2015-10-22 14:09

Electrophoresis Analysis of Protein in Seeds of *Acanthopanax senticosus* and *A. sessiliflorus* LI Xiao-lin¹, ZHANG Shun-jie², LI Ying¹, MENG Li-ming², XU Xue-liang^{1,3}, CHEN Min^{1*} (1. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herb, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Heilongjiang Forest By-product and Specialty Institute, Mudanjiang 157011, China; 3. College of Life Sciences and Technology, Mudanjiang Normal University, Mudanjiang 157012, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an appropriate sodium dodecyl sulfonate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method for identification of *Acanthopanax senticosus* and *A. sessiliflorus* seeds. **Method:** Using 15% gel SDS-PAGE, soluble proteins in *A. senticosus* seeds from 15 different locations and *A. sessiliflorus* seeds from 2 different locations were analyzed. Difference of protein band numbers, band intensity and protein molecular weight were compared by BandScan 5.0 software. **Result:** Total protein bands of 17 different seed samples were 31, 10 common bands and their own specific band of two seeds could be standard protein fingerprints of *A. senticosus* and *A. sessiliflorus* seeds. There were some differences in protein bands among *A. senticosus* seeds from various locations. **Conclusion:** This electrophoresis method and the standards protein fingerprints can be applied to identify seeds of *A. senticosus* and *A. sessiliflorus*.

[Key words] *Acanthopanax senticosus*; *A. sessiliflorus*; protein; SDS-PAGE; electrophoretogram

刺五加具有益气健脾、补肾安神的功效^[1]。药理试验证明刺五加具有保护神经元和心脑血管、抗衰老、抗氧化、抗肿瘤、降血糖及免疫调节作用等活性^[2]。短梗五加为刺五加同属的落叶灌木,作为卫

[收稿日期] 20150525(009)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09304006);国家自然科学基金项目(81102757)

[第一作者] 李晓琳,博士,助理研究员,从事中药鉴定及种子生物学研究,Tel:010-64014411-2837,E-mail:water_in_sky@163.com

[通讯作者] *陈敏,博士,高级研究员,从事中药鉴定及中药资源研究,Tel:010-64014411-2955,E-mail:cm315keke@163.com

生部批准的新资源食品大量用于制备五加果茶等保健品。随着刺五加野生资源和栽培资源的大量减少,地方上多把短梗五加与刺五加正品混用。短梗五加和刺五加种子的外观较为相似,生产中易混用,但目前关于二者种子的鉴别研究尚未见报道。

种子蛋白具有多态性、特异性和稳定性,种子蛋白电泳技术已广泛应用于农作物和植物的品种鉴定、纯度测定和亲缘关系分析等^[3-4],近年来也逐渐成为中药材种子鉴别、品种纯度测定的便捷而有效的方法之一。本实验采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析刺五加种子的产地差异、刺五加和短梗五加种子的种间差异,为这 2 味药材种子的鉴别和质量评价提供参考。

1 材料

Mini-PROTEAN Tetra Cell 型电泳槽和 PowerPac™ 系列电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),T6 系列紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),Lynx 6000 型冷冻离心机(美国 Thermo Fisher 公司),2100 型扫描仪(台湾 UMAX 公司)。宽分子质量蛋白 Maker(美国 Thermo Fisher 公司),牛血清白蛋白、聚乙烯吡咯烷酮、丙烯酰胺(上海生工生物工程公司),试剂均为分析纯。实验材料包括不同产地栽培刺五加 *Acanthopanax senticosus* 和短梗五加 *A. sessiliflorus* 种子,均经黑龙江省林副特产研究所张顺捷副研究员鉴定,均采集于 2014 年 10 月,新鲜果实经水洗,去果皮及杂质,种子阴干后保存于 4 ℃ 冰箱中。具体来源见表 1。

2 方法与结果

2.1 种子蛋白质的提取 采用酚提取-硫酸铵沉淀法^[5]。随机选取 30 粒刺五加或短梗五加的整粒种子,液氮下研磨成粉末,加入蛋白提取液[50 mmol·L⁻¹ 三羟甲基氨基甲烷(Tris)-盐酸缓冲液,含有 30% 蔗糖,1% 聚乙烯吡咯烷酮和 2% β-巯基乙醇,pH 7.5] 3 mL,冰上研磨匀浆 10 min,于 4 ℃,20 000 × g 离心 10 min 后,取上清液,加入 2 倍体积的 Tris 饱和酚,冰上提取 30 min,于 4 ℃,16 000 × g 离心 20 min,取上层酚相,加入硫酸铵甲醇溶液,-20 ℃ 沉淀过夜,于 4 ℃,16 000 × g 离心 10 min,分别加入冷甲醇 3 mL,含 0.07% β-巯基乙醇的冷丙酮 1 mL,冷丙酮 1 mL 洗涤沉淀,沉淀真空冷冻干燥后用 lysis 缓冲液完全溶解,于 20 ℃,42 000 × g 离心 15 min 后备用。

2.2 蛋白质的含量测定 以牛血清白蛋白作为标准蛋白质,利用 Bradford 法^[6]进行蛋白质定量,根据定量结果配制上样溶液。

表 1 刺五加及短梗五加种子材料及来源

Table 1 Germplasm of *Acanthopanax senticosus* and *A. sessiliflorus* seeds and their origins

No.	药材	来源地
1	刺五加	黑龙江省密山金山林场
2	刺五加	黑龙江省佳木斯汤原县正阳林场
3	刺五加	黑龙江省牡丹江市林副特产研究所
4	刺五加	吉林省通化县集安财源镇
5	刺五加	黑龙江省哈尔滨市方正县
6	刺五加	黑龙江省东方红林业局东林林场
7	短梗五加	吉林省抚松县泉阳镇
8	短梗五加	吉林省集安双岔乡
9	刺五加	黑龙江省亚布力林业局亮河林场
10	刺五加	黑龙江省密山林业局金沙林场
11	刺五加	黑龙江省虎林林业局七虎林林场
12	刺五加	黑龙江省东京城林业局
13	刺五加	黑龙江省亚布力林业局宝山林场
14	刺五加	黑龙江省伊春么河经营所
15	刺五加	黑龙江省七台河桃山区
16	刺五加	黑龙江省亚布力林业局石头河子林场
17	刺五加	黑龙江省七台河

2.3 电泳分析 采用 SDS-PAGE 法,分离胶体积分数 12%,浓缩胶体积分数 5%,胶厚 1.0 mm,电极缓冲液为 pH 8.3 的 Tris-甘氨酸缓冲液,每条泳道上样 20 μL。电泳条件为 80 V 电泳 30 min,继以 120 V 电泳 50 min,当示踪剂迁移至胶板下边缘 1.0 cm 时停止电泳。用 0.1% 考马斯亮蓝 R-250 进行染色,放入脱色液中脱色直到背景清晰。

2.4 图像分析 采用 UMAX 2100 型扫描仪对凝胶进行扫描,通过 BandScan 5.0 软件对蛋白谱带进行识别和分析。

2.5 刺五加和短梗五加种子的标准蛋白电泳图谱及种间差异 采用 SDS-PAGE 凝胶电泳法,刺五加和短梗五加种子的可溶性蛋白均得到了很好的分离,每个种子样品的蛋白谱带数目见表 2,17 个种子样品共得到 31 条蛋白谱带,见图 1。根据谱带强度可分为 2 级,染色深而明显的为 I 级谱带,染色浅但可分辨的为 II 级谱带。

由图 1 和表 2 可知,刺五加及短梗种子的蛋白电泳图谱存在一定差异,表现在蛋白谱带数目和谱带强度上。刺五加和短梗五加种子各有 11 条标准特征谱带,其中共有谱带为 10 条,包括 8 条 I 级谱带(谱带 11,17,18,19,25,26,27,29)和 2 条 II 级谱

表 2 不同产地刺五加及短梗五加种子蛋白的电泳谱带、迁移率及相对分子质量

Table 2 Bands, mobilities and molecular weights of proteins in seeds of *Acanthopanax senticosus* and *A. sessiliflorus* from different locations

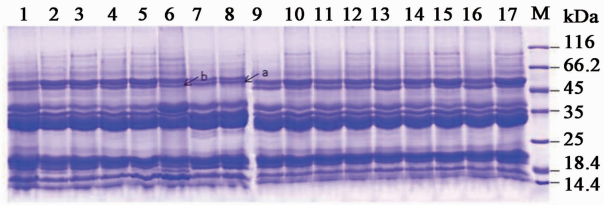
带位点	迁移率/%	相对分子质量 /kDa	种子材料																
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	6.7	116.6			-	-	-					-	-	-	-	-	-	-	-
2	10.5	107.0						-				-	-	-	-	-	-	-	-
3	15.8	94.1					-	-	-									-	
4	20.9	82.7	-	-	-	-	-	-	-			-		-			-	-	-
5	22.3	80.1	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-		-	-	-	-	-
6	23.7	77.5	-	-		-		-	-	-		-	-		-	-	-	-	-
7	24.2	76.7				-		-				-	-		-	-	-	-	-
8	27.4	70.4	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-		-	-	-	-	-
9	29.8	67.4	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-		-	-	-	-	-
10	31.6	64.6	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-		-	-	-	-	-
11	37.2	56.8	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-		-	-	-	-	-
12	39.2	54.5								-	-								
13	40.5	53.2	-	-	-	-	-	-	-			-	-		-	-	-	-	-
14	42.3	50.4	-	-	-	-	-	-	-			-		-		-	-	-	-
15	44.7	47.8	-	-	-	-	-	-	-			-	-		-	-	-	-	-
16	46.0	46.3		-	-	-	-					-		-		-	-	-	-
17	52.1	40.7	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-		-	-	-	-	-
18	55.8	36.9	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-		-	-	-	-	-
19	61.9	32.5	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-		-	-	-	-	-
20	67.0	28.5	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-		-	-	-	-	-
21	69.3	27.0	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-		-	-	-	-	-
22	72.6	25.1	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-		-	-	-	-	-
23	75.8	23.3	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-		-	-	-	-	-
24	78.6	21.8				-	-			-	-				-	-	-	-	-
25	82.5	20.7	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-		-	-	-	-	-
26	86.3	19.0	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-		-	-	-	-	-
27	88.8	17.4	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-		-	-	-	-	-
28	86.5	16.8	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-		-	-	-	-	-
29	90.2	16.7	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-		-	-	-	-	-
30	93.0	15.6								-	-				-	-	-	-	-
31	97.2	14.2	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-		-	-	-	-	-

注:有条带记为“-”。

带(谱带 9,10),上述蛋白谱带可作为刺五加和短梗五加种子的共有标准谱带。部分标准谱带在刺五加和短梗五加 2 个近缘物种间的谱带强度分布有显著差异,表现在谱带颜色深浅不同,即谱带所对应的蛋白质浓度有显著差异。刺五加种子的谱带 11(56.8 kDa)对应的蛋白质含量显著高于短梗五加种子;短梗五加种子的谱带 18(36.9 kDa),26(19.0 kDa),27(17.4 kDa)对应的蛋白质含量显著高于刺五加种子,谱带 17(40.7 kDa)对应的蛋白质含量略高于刺五加种子。这些谱带强度上的差异也可作为区分

刺五加和短梗五加种子的特征。

除了共有标准谱带外,2 种种子还分别具有一条标准特征谱带,短梗五加种子特有的 I 级谱带 12(54.5 kDa)和刺五加种子特有的 I 级谱带 13(53.2 kDa),这 2 条谱带是区别刺五加和短梗五加种子的显著特征。从谱带数目上看,刺五加种子蛋白谱带数目较多,除 9 号样品外,谱带数目均在 23~30 条;短梗五加种子蛋白谱带数目较少,2 个来源的种子均为 19 条。此外,谱带 22,23,28 在不同产地的刺五加种子均出现,而在短梗五加种子中没



a. 蛋白质谱带 12; b. 蛋白质谱带 13; M. 蛋白质 Marker; 1 ~ 6, 9 ~ 17. 刺五加; 7, 8. 短梗五加

图 1 不同产地刺五加及短梗五加种子蛋白的电泳谱

Fig. 1 Protein electrophoretogram of *Acanthopanax senticosus* and *A. sessiliflorus* seeds from different origins

有出现,所以上述 3 条谱带也可作为刺五加种子的特征谱带与短梗五加相区别。短梗五加中 II 级谱带谱带 20(28.5 kDa), 21(27.0 kDa) 对应的蛋白质含量略高于刺五加种子,在鉴别刺五加和短梗五加种子时也可作为参考。

2.6 不同产地刺五加种子的种内差异 不同产地的刺五加种子蛋白电泳图谱较为相似,种内差异相对较小,见图 1。11 条标准特征谱带的谱带强度基本一致,但部分样品略有差异。其中样品 1 和 6 中谱带 17 的蛋白质浓度显著高于其他产地,谱带 11 的蛋白质浓度相对低于其他产地,样品 9, 11, 13, 16 中谱带 13 的蛋白质浓度相对较高。颜色较浅的 II 级谱带的数目和谱带强度随产地的不同具有较大差异,呈现一定的多态性,例如谱带 4, 5 等。某些产地的蛋白电泳谱带与其他产地相比显著不同,例如来源于黑龙江东方红林业局东林林场的样品 6 中谱带 28 的蛋白质浓度显著高于其他产地,可作为该产地区别于其他产地的特征谱带。某些产地的蛋白谱带基本相同,例如来源于亚布力林业局的宝山林场和石头河子林场的样品 13 和 16, 同样来源于该林业局亮河林场的样品 9 和上述 2 个样品也很相似,说明刺五加种子蛋白电泳图谱的多态性分布和产地具有一些相关性。此外,样品 10, 12, 14, 15, 17 的谱带也基本相同,说明这些样品的亲缘关系较近。

3 讨论

目前,文献报道的种子蛋白电泳方法基本采用去种皮的种子,这是由于种皮中含有的大量酚类、色素类物质对电泳图谱的干扰很大,本文采用整粒种子作为实验材料,通过优化蛋白质提取和电泳方法,得到了清晰的刺五加和短梗五加种子的标准蛋白图谱和标准特征谱带,不仅方法简单快捷,还能得到更为全面的蛋白谱带信息,为刺五加和短梗五加种子

的种间和种内鉴定提供了更多的参考依据^[7]。

邢朝斌等^[8]发现刺五加具有较高的遗传多样性,不同产地或同一产地不同居群间存在较大的遗传分化。种子蛋白是基因表达的产物,具有多态性、特异性和稳定性,其差异是揭示植物多样性机制和遗传变异的一个方面。本文中不同产地的刺五加种子蛋白谱带所反映出的种内差异与上述研究中 DNA 水平上所表现出的遗传多样性一致。2 个不同产地的短梗五加种子的蛋白电泳图谱没有显著差异,但由于样品量太少,不足以证明短梗五加种子不具有种内差异,还需要收集更多的样品深入分析。

刺五加和短梗五加种子的水溶性蛋白中贮藏蛋白的丰度极高,在蛋白图谱上表现为几条颜色深、带型宽且明显的 I 级谱带,导致其他蛋白丰度很低,谱带颜色浅,仅可分辨,与其他种子蛋白图谱上的 III 级谱带强度相同,而不具有中间强度的谱带。某些产地的低丰度蛋白谱带的缺失可能仅仅是由于该蛋白的浓度低于本文的检测限,不能确定该产地种子在蛋白组成和含量上与其他产地不同,对这些极低丰度蛋白谱带上的差异还需进一步验证和研究。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:192-193.
- [2] 贾继明,王宏涛,王宗权,等. 刺五加的药理活性研究进展[J]. 中国现代中药,2010,12(2):7-10.
- [3] 国际种子检验协会. 国际种子检验规程[M]. 北京:中国农业出版社,1996:196.
- [4] 王照兰,杜建材,史万光,等. 胡枝子属种质材料的种子蛋白图谱研究[J]. 中国草地学报,2013,35(5):11-16.
- [5] Hurkman W J, Tanaka C K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis[J]. Plant Physiol,1986,81(3):802-806.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem,1976,72(1):248-254.
- [7] 胡志昂,王洪新. 蛋白质多样性和品种鉴定[J]. 植物学报,1991,33(7):556-564.
- [8] 邢朝斌,劳风云,吴鹏,等. 利用随机扩增多态性 DNA 技术分析刺五加的遗传多样性[J]. 时珍国医国药,2008,19(6):1305-1307.

[责任编辑 刘德文]