

异, DH7a 和 DH5a 显著地高于 DH5c 和 DH5d。

由于克隆与培养基之间存在互作, 对其进一步分析结果表明, 4 种单克隆大黄毛状根在不同培养基上蒽醌产量差异显著。以 DH7a 在 B5 培养基上蒽醌产量最高, DH5a 在 WP 培养基上次之, 以 DH5d 在 B5 培养基上产量最低。

3 讨论

研究表明, 不同毛状根无性系具有不同的生长速率及次生代谢产物量, 这是由于毛状根起源于单细胞, 这些细胞在大小、结构、遗传、生理生化特征上各不相同, 其代谢状态和合成次生代谢物的能力也不同, 因此不同毛状根克隆系之间存在很大差异^[5~8]。本实验诱导产生的 4 个单克隆毛状根株系中, 其生物量积累和 5 种游离蒽醌总量存在显著差异, 以克隆 DH7a 生长速率快, 且蒽醌化合物含量高, 因此, 要提高蒽醌化合物含量, 必须对毛状根细胞系进一步筛选, 以获得生长速度快和蒽醌化合物含量高的细胞系。

各种培养基由于所含组分及其比例不同, 对毛状根生长及次生代谢产物的形成有不同的影响^[9,10]。不同培养基的无机元素浓度差异很大, 一般分为高盐、高硝酸钾、中盐和低盐 4 种类型, 对植物细胞生长和次生代谢产物的形成必然会有较大的差异。培养基中硝态氮和铵态氮之间的比例也会影响毛状根生长和次生代谢产物的合成^[11]。本实验中, WP 培养基最有利于掌叶大黄毛状根生物量积累, 显著优于 MS、N6 和 B5 培养基。对培养基优化的研究有待进一步深入, 应采用统计分析方法对培养基

中各种成分进行多因素多水平的筛选。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [2] Ye B L. Plant resources of *Rheum* in Qinghai Province [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 1996, 19 (6): 280-281.
- [3] Liu B Y, Ye H C, Li G F. The latest progress of the application of Ri plasmid in plant science [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 1998, 15 (4): 1-7.
- [4] Yang S H, Liu X F, Guo D A. Effect of rare-earth elements La^{3+} on growth of hairy roots and normal roots of *Rheum palmatum* and their yield of anthraquinone [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35 (10): 1171-1174.
- [5] Mano Y, Nabeshima S, Matsui C, et al. Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica* [J]. *Agric Biol Chem*, 1986, 50: 2715-2722.
- [6] Chen M, Wang H Y, Liao Z H, et al. Review of studies on medicinal plants transformed by *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 12 (3): 98-102.
- [7] Li B H, Zhang H M, Ding R X, et al. Establishment of hairy root culture of autotetraploid indigobule woad (*Isatis indigotica*) and different extrinsic factors affecting the growth [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (2): 132-134.
- [8] Zhao S J, Li C Y, Qian Y C, et al. Induction of hairy roots of *Panax ginseng* and studies on suitable culture condition of ginseng hairy roots [J]. *Chin J Biotech* (生物工程学报), 2004, 20 (2): 215-220.
- [9] Lui H L, Zhang Y Z, Tao W Y. Effects of nutrition and environmental factors on growth and alkaloid production of *Catharanthus roseus* hairy-roots [J]. *Pharm Biotecnol* (药物生物技术), 2003, 10 (3): 155-158.
- [10] Wang C Z, Ding J Y. Effects of different media* and phytohormones on the growth and ginsenoside content of *Panax quinquefolium* L. hairy root [J]. *J Plant Resour Environ* (植物资源与环境学报), 2001, 10 (4): 1-4.
- [11] Bensaddek L, Gillet F, Saucedo J E, et al. The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots [J]. *J Biotechnol*, 2001, 85 (1): 35-40.

半夏药材中蛋白质 IEF 电泳图谱的研究

黄必胜, 陈科力*, 曹 艳

(湖北中医学院, 湖北 武汉 430061)

摘要:目的 通过对半夏及其近缘植物的蛋白质电泳图谱比较, 研究半夏药材的电泳鉴别方法。方法 应用等电聚焦(isoelectrofocusing, IEF)技术, 对不同产地半夏及其近缘植物块茎进行比较。结果 半夏具有稳定的 IEF 电泳图谱, 显示具有 8 条特征蛋白质带, 并测定了其等电点(PI)值, 半夏与其几种近缘植物的 IEF 谱有明显的区别。结论 半夏 IEF 电泳图谱可作为半夏药材的鉴别依据, 半夏特征蛋白质的 PI 值为半夏的鉴定和蛋白质分离纯化提供了参数。

关键词:半夏; 掌叶半夏; 水半夏; 蛋白质电泳; 等电聚焦

中图分类号: R282.7

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)04-0598-03

IEF Electrophorogram of protein in *Rhizoma Pinelliae*

HUANG Bi-sheng, CHEN Ke-li, CAO Yan

(Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

Abstract: Objective To discriminate *Rhizoma Pinelliae* from its relative species by electrophorogram of protein. **Methods** Using isoelectrofocusing (IEF) technology to compare the electrophorogram of tuber of *Pinellia ternata* produced in different habitats and from its relative plants then determining the pH values. **Results** The IEF electrophorogram of *Rhizoma Pinelliae* was stable with eight clear characteristic protein bands and had obvious differences from the electrophorogram of the tubers of its relative plants. **Conclusion** The IEF electrophoresis of *Rhizoma Pinelliae* can be used as the distinguishing basis. The PI value of the characteristic protein of *P. ternana* offers the basic parameter for separation and purification of the protein in *Rhizoma Pinelliae*.

Key words: *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.; *P. pedatisecta* Schott; *Typhonium flagelliforme* (Lodd.) Blume; protein electroforesis, isoelectrofocous (IEF)

半夏为常用中药材,但在使用上存在品种混乱现象,其同科和同属近源植物掌叶半夏和水半夏在某些地区作半夏使用,且一直缺乏有效的理化鉴别方法。本文采用等电聚焦(IEF)技术对不同产地的半夏及其近缘品种块茎进行了蛋白质电泳谱的比较研究,希望为半夏药材的品种鉴别提供科学的依据。

1 仪器与试剂

DYY-6B 型电泳仪, DYY-Ⅲ 27 型圆盘电泳槽, 90 mm×5 mm 玻璃管 8 支。过硫酸铵(AP), 磷酸, 乙二醇胺, N-N 亚甲基双丙烯酰胺, 四甲基乙二胺(TEMED), PH4-10 两性电解质(中国医药集团上海生化试剂有限公司), 其他试剂均为 AR 级。

样品均由作者采集并鉴定, 鞭檐犁头尖由广东省中药学校王玉生教授鉴定, 材料见表 1。

表 1 样品来源

Table 1 Source of samples

序号	品名	原植物学名	生长状态	采集地	采集时间
01	半夏	<i>Pinellia ternata</i>	野生	江西庐山	2004-04
02	半夏		野生	武汉蛇山	2004-05
03	半夏		野生	湖北钟祥	2004-05
04	掌叶半夏	<i>P. pedatisecta</i>	栽培	湖北中医学院药园	2004-05
05	掌叶半夏		野生	湖北钟祥	2004-05
06	鞭檐犁头尖	<i>Typhonium flagelliforme</i>	野生	广东湛江	2004-06
07	滴水珠	<i>P. cordata</i>	野生	湖北英山	2004-06

2 方法和结果

2.1 样品液的制备: 精确称取上述各种新鲜样品 2 g, 置于研钵中, 加冰水(三蒸水) 5 mL 匀浆后, 置试管中离心(4 000 r/min) 15 min, 取上清液即得样品液, 样品液置 4℃ 冰箱中备用。

2.2 凝胶的制备: 在 10 mL 烧杯中依次加入 30% 凝胶母液 0.625 mL, 40% 两性电解质 0.19 mL, 样品液 80 μL, 三蒸水 1.7 mL, 10% AP 20 μL, TEMED 0.2 mL, 混匀后立即灌注。胶加到离顶部

约 3 mm 处(注意管内不能有气泡), 胶上再小心覆盖水层, 以隔绝空气并使胶面平整, 室温下聚合 30~40 min, 待胶水面清晰可见后, 缓缓倾出水层。空白管依法操作, 但不加样品液。

2.3 电泳槽的安装: 制备好的 8 支凝胶管, 编号并分别用阳极电泳液(5% 磷酸缓冲液)清洗各管下端, 用阴极电泳液(5% 乙二醇胺)冲洗上端。按统一的方法垂直固定于圆盘电泳槽中, 上槽加阴极电泳液(以浸没胶管为宜), 下槽加入阳极电泳液(以凝胶管浸入 3/5 为宜)。

2.4 等电聚焦: 按上(一)下(+)接通电源, 调恒压 200 V 进行电泳, 电流不断下降, 最后以电流不再下降(电流指示为 0)作为电泳完毕标志。全程电泳约 2 h。

2.5 固定、染色、脱色: 电泳结束后, 从电泳槽中小心取出各凝胶管(标记好各管的上下端)。用三蒸水洗涤凝胶管两端及玻璃管外壁 3 次, 随后取出胶条, 精确测量胶管的长度后将样品胶柱置于 20% 三氯乙酸中固定 30 min, 然后置于染色液中染色 3~6 h, 取出, 7% 乙酸脱色 24 h, 其间每隔 1 h 换一次脱色液, 直到谱带背景清晰为止, 进行观察。样品胶柱上出现清晰的谱带, 结果见图 1。

2.6 pH 值测定: 取空白胶柱按 0.5 cm/段切成若干段, 分别置于各已编号并盛有 1 mL 三蒸水的试管中, 4℃ 下浸泡 1 h, 用精密 pH 计测定各样品段浸泡液的 pH 值。

测定结果见表 2。以空白管各段胶所在的位置(即胶

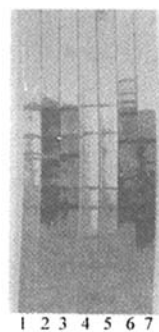


图 1 半夏药材 IEF 图谱样品 1~7

Fig. 1 IEF Electrophorogram of protein in *Rhizoma Pinelliae* samples No. 1~7

柱的长度)为横坐标,一相对应的浸泡液 pH 值为纵坐标作图,可求得各样品胶柱上 pH 梯度曲线。

表 2 pH 值测定结果

Table 2 Result of pH value

柱长/cm	pH 值	柱长/cm	pH 值
0.5	9.4	5.0	5.2
1.0	8.9	5.5	5.0
1.5	8.2	6.0	4.8
2.0	7.8	6.5	4.5
2.5	7.5	7.0	4.2
3.0	7.0	7.5	3.7
3.5	6.5	8.0	3.1
4.0	6.0	8.5	2.0
4.5	5.5		

2.7 半夏(A 庐山、B 蛇山、C 钟祥)新鲜品自然干燥 1 周,其中钟祥半夏按照炮制方法^[2]炮制成清半夏(D)、姜半夏(E)。将上述 5 种样品按 2.1 制备样品液,按电泳方法操作,结果见图 2。

3 讨论

3.1 由图 1 可见不同产地半夏具有相似的谱带,其中江西庐山半夏因采集时间早,样品个头小,谱带较弱;半夏的近缘植物谱带与半夏有明显的区别,可用此鉴别半夏药材。

3.2 由图 2 可见干燥的半夏除具有原有的谱带外,在主带附近新增了细小的条带,可能是干燥的过程中蛋白质发生部分降解,估计放置时间越长降解越多,但干半夏和新鲜半夏的谱带非常接近。半夏炮制品中清半夏虽经过浸泡处理,但未经过高温处理,仍然有微弱条带;姜半夏由于经过了高温处理,蛋白质已变性,故无带。由该实验方法可方便、准确地鉴别

半夏药材,且不同产地半夏具有相对稳定的谱带。

3.3 因胶柱经固定后其长度会发生变化,故由 pH—胶柱长度关系曲线求被测样品(半夏)所含主要蛋白质成分的等电点(PI),所用长度是经校正后的长度即:

胶柱长度 = 蛋白质迁移距离 × 原胶柱长(固定前)/现胶柱长(固定后)

根据样品各条谱带在各自 IEF 胶柱上的位置(经校正后),再分别与各自的 pH—长度关系曲线对比,可方便得出样品中主要蛋白质 PI 值。半夏(3 种不同产地的半夏具有相同的谱带,可认为是半夏的特征谱带)8 种主要蛋白质的 PI 值是:6.50,5.90,5.40,5.30,5.18,5.03,4.82,4.60。

3.4 两性电解质的加入是为了在电泳支持物上产生适宜平滑的 pH 梯度。本实验采用将样品液混入凝胶液中的点样方法,既简化了操作,增大了加样量,又避免了样品液在胶柱中所占的一段 pH 梯度,从而扩大了电泳分离范围,提高分辨率并缩短电泳时间。

References:

- [1] He Z X, Zhang S Z. *Electrophoresis* (电泳) [M]. 2nd. Beijing: Science Press, 2000.
- [2] Gong Q F. *Herb Processing* (中药炮制学) [M]. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2003.

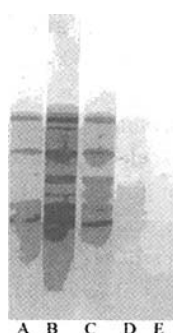


图 2 不同产地干燥品及炮制品 IEF 图谱

Fig. 2 IEF Electrophorogram of protein in dry and processed *P. ternana* from different habitats

HPLC-ELSD 测定彭泽贝母中浙贝甲素和浙贝乙素

刘红宁¹, 颜冬梅¹, 朱卫丰¹, 饶毅²

(1. 现代中药制剂教育部重点实验室 江西中医学院, 江西 南昌 330004;

2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 建立 HPLC-ELSD 测定彭泽贝母中浙贝甲素、浙贝乙素的分析方法。方法 以 C₁₈柱为色谱柱, 蒸发光散射检测器, 运用 HPLC 法分离及分析彭泽贝母中的浙贝甲素和浙贝乙素。结果 建立了 HPLC-ELSD 测定彭泽贝母中浙贝甲素、浙贝乙素的分析方法: 色谱柱: Hypersil ODS₂ (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃。流动相: 乙腈-0.03% 二乙胺水 (65:35), 体积流量 1.0 mL/min。检测器参数: 漂移管温度 83.5 ℃, 载气体积流量 2.2 mL/min, 进样量 10 μL。结论 运用 HPLC-ELSD 能够同时测定彭泽贝母中浙贝甲素、浙贝乙素的量。

关键词: 浙贝甲素; 浙贝乙素; HPLC-ELSD

中图分类号: R282.6

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)04-0600-03