

白藜芦醇产量有显著的负影响。

处理后期各处理组对苗期毛脉酸模根中除酸模素和大黄素外,其他5种次生代谢产物(白藜芦醇、白藜芦醇、大黄酚苷、大黄酚、大黄素甲醚)的产量都受到了明显的抑制。

4 讨论

大斑病长蠕孢001对苗期毛脉酸模根中白藜芦醇、酸模素、大黄酚的量和产量有影响,其中对白藜芦醇量的促进影响仅存在于中前期。对酸模素量的影响表现为中前期促进,中后期抑制。对大黄酚量的影响仅存在于后期而且为抑制作用。大斑病长蠕孢001对白藜芦醇的产量表现为前期促进后期抑制,对酸模素、大黄酚的产量的前期促进作用不显著,后期抑制作用较明显。

大斑病长蠕孢002对苗期毛脉酸模根中白藜芦醇、酸模素、大黄酚的量和产量有影响,其中对白藜芦醇、酸模素量的促进影响仅存在于中前期;对大黄酚量的促进影响仅存在于前期。但处理后期对上述3种次生代谢产物量的影响不明显,大斑病长蠕孢002对上述3种次生代谢产物产量处理前期影响不显著,处理后期对酸模素、大黄酚产量表现为明显的抑制。

玉蜀黍长蠕孢对苗期毛脉酸模根中酸模素的量影响前期不明显,中后期(20~50 d)表现为促进,对酸模素产量在后期表现为明显促进作用。对大黄素的量和产量在处理中前期促进作用不明显。但处理后期对其量和产量表现为明显的促进作用。

实验结果证明,3株长蠕孢属真菌叶面侵染苗期

毛脉酸模处理时间超过40 d,苗期毛脉酸模根的生物量开始受到抑制。因此对苗期毛脉酸模的长蠕孢属真菌诱导处理时间不宜超过40 d,如果对其6种次生代谢产物(大黄素除外)综合考虑应选在毛脉酸模采收前30 d进行诱导处理为最佳。如果仅从生物活性成分白藜芦醇的角度考虑,选择大斑病长蠕孢001进行诱导处理,处理时间为采收前30 d进行处理。同时笔者还研究了上述3株真菌对幼苗期毛脉酸模中的白藜芦醇苷和白藜芦醇的影响。结果表明采取根部感染的方式,同样可以使幼苗期毛脉酸模中白藜芦醇的量和产量提高。但是长蠕孢属真菌侵染毛脉酸模致使其生物活性成分白藜芦醇的量发生变化的机制并不清楚,有待进一步深入的研究。

References:

- [1] Hou P Y, Guo S X. Fungal elicitation to plants and its application in natural medicines [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 33(9): 855-857.
- [2] Ingham J L. 3,5,4'-Trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts (*Arachis hypogaea*) [J]. *Phytochemistry* (植物化学), 1976, 15: 1791-1793.
- [3] He L Y, Chen B Z, Xiao P G. Survey identification and chemical constituents in medical plants of *Rumex* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1981, 16(4): 289-293.
- [4] Gao L M, Wei X M, Zhen S Z, et al. Study on chemical constituents of *Rumex patientia* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(3): 207-209.
- [5] Yuan Y, Chen W S, Yang Y J, et al. Anthraquinones from *Rumex patientia* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(5): 330-332.
- [6] Zhao B, He S J. *Microbiology Experiment* (微生物实验) [M]. Beijing: Science Press, 2002.
- [7] Sun G Y, Zong Z F. *Laboratory Technique of Plant Pathology* (植物病理学实验技术) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002.

肉苁蓉属4种肉苁蓉可溶性蛋白的SDS-PAGE电泳分析

陈培,郭玉海*,王保民,翟志席

(中国农业大学农学与生物技术学院 中药材研究中心,北京 100094)

摘要:目的 对肉苁蓉属4个种进行鉴别。方法 采用可溶性蛋白质SDS-PAGE凝胶电泳。结果 肉苁蓉属4个种的SDS-PAGE图谱存在显著差异,其多态性条带为81.82%。结论 各个种的电泳图谱可以相互区别,肉苁蓉属可溶性蛋白的SDS-PAGE图谱可作为种间鉴定的蛋白指纹图谱。

关键词:肉苁蓉属;可溶性蛋白;SDS-PAGE;种间鉴定

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)09-1399-04

收稿日期:2005-12-15

基金项目:重大基础研究前期研究专项(2004CCA01200)

作者简介:陈培(1972—),女,河南叶县人,博士研究生,主要从事肉苁蓉蛋白质组研究。

Tel: (010)62733853 E-mail: chenpei168@sohu.com

* 通讯作者 郭玉海

SDS-PAGE of soluble proteins in four plants of *Cistanche Hoffing. et Link*

CHEN Pei, GUO Yu-hai, WANG Bao-min, ZHAI Zhi-xi

(Center of Chinese Medicinal Materials, College of Agronomy and Bio-Technology,
China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Objective To identify four species of *Cistanche Hoffing. et Link*. **Methods** SDS-PAGE Electrophoresis of soluble proteins was used. **Results** Their degrees of polymorphism were 81. 82%. Each species which had its own unique band pattern distinguish from the others. **Conclusion** The electrophoresis pattern of SDS-PAGE of soluble proteins can be regarded as protein fingerprints for identification of various species of *Cistanche Hoffing. et Link*.

Key words: *Cistanche Hoffing. et Link*; soluble-protein; SDS-PAGE; species identification

受遗传基因控制的蛋白质分子普遍存在于植物细胞内,其中可溶性蛋白在植物发育过程中具有较强的异质性和相对稳定性。蛋白质指纹图谱技术已广泛应用于品种的鉴定和分类,如小麦、大麦、玉米、水稻、豌豆等作物^[1,2]。目前,大麦和小麦品种醇溶蛋白电泳技术、豌豆属和黑麦草属聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)以及玉米品种醇溶蛋白超薄等电聚焦(IEF)已列入国际种子检验规程^[3]。小麦醇溶蛋白品种鉴定和玉米种子纯度盐溶蛋白质电泳鉴定方法也已分别列入“中华人民共和国农作物种子检验规程”(GB/T3543. 5-1995)和农业部行业标准(NY/T499-2001)。但是,蛋白质指纹图谱技术在肉苁蓉鉴定和分类中的研究还未见报道。

肉苁蓉为列当科肉苁蓉属(*Cistanche Hoffing. et Link*)多年生寄生草本植物的干燥带鳞叶的肉质茎,是常用名贵中药^[4]。我国有肉苁蓉属植物 4 种 1 变种,分别为荒漠肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma、盐生肉苁蓉 *C. salsa* (C. A. Mey.) G. Beck、白花盐苁蓉 *C. salsa* var. *albiflora* P. F. Tu et Z. C. Lou、沙苁蓉 *C. sinnensis* G. Beck 和管花肉苁蓉 *C. tubulosa* (Schenk) R. Wight^[5],其主要产地、有效成分及质量分数各不相同^[6~8],本研究以肉苁蓉属的 4 种肉苁蓉为材料,探索可溶性蛋白电泳指纹图谱与种鉴定之间的关系,试图为肉苁蓉鉴别提供一项新的评价指标,同时为建立中药材电泳图谱库提供材料。

1 材料和方法

1.1 实验材料:管花肉苁蓉、荒漠肉苁蓉、盐生肉苁蓉和沙苁蓉分别取自新疆于田、内蒙阿拉善试验基地和宁夏盐池。试验材料具有代表性,并由郭玉海教授鉴定,见表 1。

1.2 样品制备:取同一大小 4 种肉苁蓉的新鲜肉质茎各 20 g,分别切成 0.5 cm 见方的小块。冷冻干燥

表 1 试验材料的主要特征

Table 1 Main characteristics of experimental materials

种 名	寄 主	产地来源
管花肉苁蓉	柽柳属	新疆于田(人工柽柳林)
荒漠肉苁蓉	梭梭	内蒙古阿拉善(人工梭梭林)
盐生肉苁蓉	藜科盐爪爪	宁夏盐池(野生)
沙苁蓉	藜科四合木	宁夏盐池(野生)

一昼夜。称取干燥样品各 0.5 g 加入 3 mL 可溶性蛋白提取液(0.08 mol/L Tris-HCl, pH6.8)(稀释 4 倍的浓缩胶缓冲液+2%PVP40)。冰浴研磨成匀浆。转至离心管,提取 30 min 后 4 ℃,10 000 r/min 离心 30 min,取上清液加入 10 倍体积的冷丙醇(-20 ℃),洗涤沉淀 3 次,每次 4 ℃,10 000 r/min 离心 15 min,沉淀物真空干燥,-20 ℃贮存,备用。

1.3 电泳:取上述制备的样品 0.5 mg 加入 1 mL 样品缓冲液[4 mL 浓缩胶缓冲液(1 mol/L Tris-HCl, pH 6.8)+10 mL 10%SDS+13 mL β-巯基乙醇+6.25 mL 87%甘油,用双蒸水稀释 50 mL],上样前将样品在 100 ℃煮 3~5 min,10 000 r/min 离心 5 min,上样量 20 μL。采用 SDS-PAGE 垂直板电泳 Laemmli 不连续系统,并作适当改变,分离胶质量分数 15%,浓缩胶质量分数 3%。分离胶长 13 cm,浓缩胶长 2.5 cm,胶板厚度为 1 mm。电极缓冲液使用 Tris-甘氨酸^[9](0.025 mol/L Tris, 0.192 mol/L 甘氨酸,0.1%SDS, pH8.3)。指示剂在浓缩胶时,电压为 180 V,当指示剂进入分离胶后,电压调至 210 V,电压采用稳压档,在常温下进行,当指示剂迁移至距胶板下缘 1 cm 时停止电泳,电泳全过程约 5~6 h,电泳结束,迅速进行染色和固定。

1.4 凝胶染色:采用 0.25%考马斯 R-250(45%甲醇+45%双蒸水+10%乙醇+0.25%考马斯 R-250)进行染色,染色时间约为 4~5 h,染色和固定同时进行。然后进行脱色,多次再换脱色液(45%甲醇+45%双蒸水+10%乙醇),至背景清晰为止。

1.5 凝胶成像:采用 AlphaImager 2200 凝胶成像系统对脱色后背景清楚的凝胶进行成像。

1.6 数据处理:电泳图谱中间的 M 泳道为低相对分子质量(M_r)标准蛋白质,该条带蛋白从上到下分别为兔磷酸化酶 B (M_r 97 400)、牛血清白蛋白(M_r 66 200)、兔肌动蛋白(M_r 43 000)、牛碳酸酐酶(M_r 31 000)、胰蛋白酶抑制剂(M_r 20 100)和鸡蛋清溶菌酶(M_r 14 400)。用 M_r 标准蛋白质作标准曲线,利用 AlphaImager 2200 软件对蛋白带进行分析,测出每条带的 M_r 。所有的测量位置在蛋白带的中央。

2 结果

肉苁蓉属 4 个种可溶性蛋白经 SDS-PAGE 得到了较好的分离效果,见图 1、表 2。结果表明,4 个种的肉苁蓉可溶性蛋白电泳图谱共分离出 11 条蛋白带,不同种的电泳谱带在数目、迁移率及谱带的强度方面差异显著。即不同种的肉苁蓉可溶性蛋白的电泳图谱不同。相对分子质量为 30 200、23 200 的 2 条带是 4 个种共有的带,其他 9 条带有不同程度的差异。多态性条带占 81.82%,根据这 9 条带的有无可区分肉苁蓉属的 4 个种。相对分子质量 67 500 条带是沙苁蓉和管花肉苁蓉 2 个种共有的条带。相对分子质量 31 200 条带是沙苁蓉和荒漠肉苁蓉共有的条带。相对分子质量 24 800 条带是盐苁蓉和荒漠肉苁蓉共有的条带。相对分子质量 45 900、34 000、21 100 条带是沙苁蓉特有的条带。相对分子质量 65 300 条带是管花肉苁蓉特有的条带。相对分子质量 158 000 条带是盐苁蓉特有的条带,相对分子质量 17 700 条带是荒漠肉苁蓉特有的条带。同时在相对分子质量 23 200、21 100、15 800 条带处染色较深,即这 3 个带的蛋白量高。

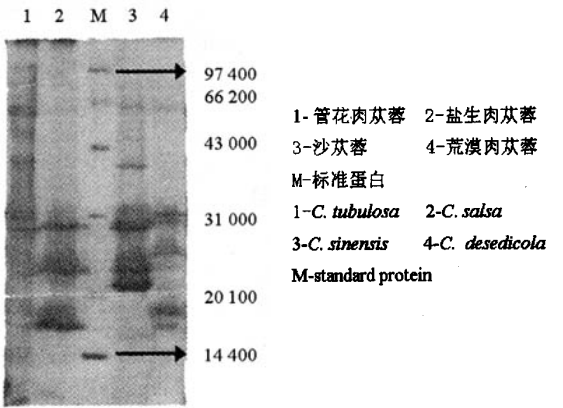


图 1 肉苁蓉可溶性蛋白 SDS-PAGE 图谱
Fig. 1 SDS-PAGE of soluble protein in plants of *Cistanche* Hoffing. et Link

表 2 肉苁蓉属可溶性蛋白的 SDS-PAGE 结果
Table 2 Result of soluble protein in plants of *Cistanche* Hoffing. et Link by SDS-PAGE

M_r	管花肉苁蓉	盐生肉苁蓉	沙苁蓉	荒漠肉苁蓉
67 500	+	—	+	—
65 300	+	—	—	+
45 900	—	—	+	—
34 000	—	—	+	—
31 200	—	—	+	+
30 200	+	+	+	+
24 800	—	+	—	+
23 200	+	+	+	+
21 100	—	—	+	—
17 700	—	—	—	+
15 800	—	+	—	—

试验重复次数在 5 次, + 表示有条带, — 表示没有条带
Experimentation is repeated 5 times, + indicates protein bands, — indicates no protein bands

经过多次重复试验,每一种内可溶性蛋白电泳谱带重现性良好,稳定性良好。可溶性蛋白电泳图谱的特异性,可作为肉苁蓉的种间鉴定和分类的生化依据。

3 讨论

分子生物学研究表明,种之间的差异主要取决于遗传物质的差异,蛋白质是基因的产物,可作为种鉴定的依据^[10]。蛋白质图谱技术在农作物分类和品种鉴定中已成为常规技术,但在药用植物中研究较少,特别是在不同种的肉苁蓉分类和鉴定方面还未见研究报道。本试验结果表明,肉苁蓉属不同种可溶性蛋白的 SDS-PAGE 图谱种间差异明显,不同种都有各自的特异的可溶性蛋白质,这为肉苁蓉种间鉴定提供了一个新的生化指标和一种新的鉴定手段。采用这种方法,对不同种肉苁蓉鉴定具有简单、快速、准确、微量等优点,在粉末状肉苁蓉材料的鉴定方面具有明显特点。

研究表明,不同种肉苁蓉有效成分的组成和量各不相同,不同种肉苁蓉的特异蛋白质与有效成分相关关系仍是一个值得深入研究的问题。

References:
[1] Gooke R J. *Handbook of Variety Testing* (品种鉴定手册) [M]. Switzerland: ISTA, 1992.
[2] Draper S R. ISTA Variety committee report of the working group for biochemical tests for cultiva identification 1983—1986 [J]. *Seed Sinc Technol*, 1987, 15: 431-434.
[3] Zhang X Y, Yang X M, Dong Y S. Application of alco protein electrophoresis in Genetic analysis of wheat germplasm resource [J]. *Agric Sci China* (中国农业科学), 1998, 31(4): 16-19.
[4] Song Z H, Tu P F, Zhao Y Y. Research of chemical constituents of *Cistanche tubulosa* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(11): 808-810.
[5] Tu P F, He Y P, Lou Z C. Survey and protection of medicinal resources of desert living *Cistanche* (*Cistanche deserticola*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1994,

- 24(4): 205-208.
- [6] Lei L, Song Z H, Tu P F. Advances in research of chemical constituents in plants of *Cistanche Hoffing.* et Link [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(5): 473-476.
- [7] Zhou Z J. Advances in research of *Cistanche Hoffing.* et Link [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 5: 28-30.
- [8] Xu W H, Qiu S X, Shen L Z. Comparing the chemical constituents and pharmacologic actions of *Cistanche desedicola* and *C. salsa* (C. A. Mey.) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 26(3): 143-146.
- [9] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 685-690.
- [10] Lan H Y, Li L H. Application of proteins gel electrophoresis in the identification of crop varieties [J]. *Agric Sci China* (中国农业科学), 2002, 35(8): 916-920.

天麻液相色谱指纹图谱研究

王 莉, 程孟春, 肖红斌*, 梁鑫森*

(中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116012)

摘 要:目的 建立天麻的液相色谱指纹图谱, 为科学评价及有效控制天麻质量提供新方法。方法 采用 HPLC 法分析不同产地的 18 个天麻样品, 确定指纹峰并进行对照药材相似度、共有模式相似度的计算, 用纯品随行对照结合 LC-MS 对主要指纹峰进行定性鉴定。结果 建立了由 27 个指纹峰和 17 个共有峰组成的天麻液相色谱指纹图谱, 指纹峰具有特征性, 鉴定了其中 12 个主要的指纹峰。用对照药材相似度, 可将天麻样品分为 3 类: 安徽河南产天麻、陕西四川产天麻和云南产天麻。两个相关系数分界点为 0.80 和 0.58, 夹角余弦分界点为 0.88 和 0.73。结论 所选指纹峰有特征性, 建立的指纹谱可用于区别 3 个产地的天麻药材, 并为进一步控制天麻质量提供依据。

关键词:天麻; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 相似度

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)09-1402-04

HPLC Fingerprint of *Gastrodia elata*

WANG Li, CHENG Meng-chun, XIAO Hong-bin, LIANG Xin-miao

(Dalian Institute of Chemicphysics, The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116012, China)

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprint for evaluating and controlling the quality of *Gastrodia elata*. **Methods** HPLC Analysis and similarity calculation were used for establishing fingerprint chromatogram and classifying 18 different original samples; LC-MS and pure compound comparisons were employed for the fingerprint peaks identification. **Results** HPLC Fingerprint chromatogram was constructed with 27 fingerprint peaks, 17 of which were common fingerpring peaks and 12 main compounds were identified. According to the similarity to standardize herbal medicine, 18 samples could be classified three groups, Anhui-Henan, Shanxi-Sichuan, and Yunnan habitats. The two critical points were 0.80 and 0.58 for correlation coefficient and 0.88 and 0.73 for cosine values. **Conclusion** The selected fingerprint peaks are diagnostic for *G. elata* and the constituted HPLC fingerprint chromatogram could be used for identifying different habitats and served as a powerful tool for further quality control of *G. elata*.

Key words: *Gastrodia elata* Bl.; HPLC; fingerprint; similarity

天麻为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎, 主治头痛眩晕、肢体麻木、癫痫抽搐等症。其质量控制多用高效液相法测定天麻素的量或用毛细管电泳测定其他几个活性成分的量^[1~3]。指纹图谱是控制天然药物质量的有效方式之一, 已日益成为

国内外广泛接受的中药质量评价模式^[4,5]。本实验通过收集天麻主产地的 18 个样品进行指纹图谱研究, 最终建立了由 27 个指纹峰和 17 个共有峰组成的天麻液相色谱指纹图谱; 由对照药材相似度及共有模式相似度的计算, 可以较好地地区分不同产地的天麻

收稿日期: 2005-10-12

基金项目: 中科院知识创新工程重要方向项目(KGCX2-SW-213); 国家自然科学基金重点项目“中药药效组分的指纹图谱分析的方法研究”(20235020)

作者简介: 王 莉(1975—), 女, 博士在读, 主要从事中药的分离分析工作。 E-mail: wlhws@dicp.ac.cn

* 通讯作者 肖红斌 梁鑫森