

不同种质资源蛇足石杉引种及差异蛋白比较分析

林如辉¹, 张丹凤², 张靖², 周以飞², 潘大仁^{2*}

1. 福建省食品药品监督管理局培训中心, 福建 福州 350001

2. 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002

摘要: 目的 筛选野生蛇足石杉引种驯化的优质种质资源, 并建立其分子鉴别方法。方法 对来自福建大田、三明市郊、南靖 3 个不同种质资源野生蛇足石杉引种驯化, HPLC 法分析不同种质资源蛇足石杉中石杉碱甲 (Hup A) 量; 采用蛋白质双向电泳技术, 分析不同种质资源蛇足石杉差异蛋白。结果 种质资源来自大田的蛇足石杉适应性较强, 植株长势好, 成活率为 65.5%, 且茎叶 Hup A 量也较高, 分别为 197.80 和 87.54 $\mu\text{g/g}$; 遮阳成活率为 77.8%, 远高于未遮阳的成活率 (7.1%); 黄土地成活率为 75%, 远高于水田沙壤土的成活率 (18.8%)。不同种质资源蛇足石杉共有 15 个差异蛋白质点, 不同种质资源蛇足石杉的差异蛋白质点丰度差异较大。结论 人工引种栽培时, 土壤选择以黄土质为佳, 并需要给予必要的遮阳; 种质资源来自福建大田的蛇足石杉可以作为蛇足石杉优质种质资源进行引种驯化; 利用蛇足石杉差异蛋白质点的丰度差异, 可以作为鉴别不同蛇足石杉种质资源的依据。

关键词: 不同种质资源; 蛇足石杉; 石杉碱甲; 差异蛋白; 引种驯化

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)01-0113-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.01.022

Introduction of *Huperzia serrata* for selecting different germplasm resources and comparative analysis on differences in protein

LIN Ru-hui¹, ZHANG Dan-feng², ZHANG Jing², ZHOU Yi-fei², PAN Da-ren²

1. Training Center of Fujian food and Drug Administration, Fuzhou 350001 China

2. College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350003, China

Abstract: Objective To select the high quality germplasm resources from the wild *Huperzia serrata* during introduction and domestication and to establish the method of molecular identification. **Methods** After introduction and domestication, three different germplasm resources of *H. serrata* from Datian, Sanming suburb, and Nanjing were used to determine the contents of huperzine A (Hup A) by HPLC and to analyze the differential protein by two-dimensional gel electrophoresis of protein. **Results** *H. serrata* from Datian showed the strong adaptability in the growth potential, survival ratio of 65.5% with higher contents of Hup A, 197.80 and 87.54 $\mu\text{g/g}$ in the stems and leaves of *H. serrata*, respectively. The survival ratio of *H. serrata* was 77.8% under shadow, far higher than that (7.1%) under non-shadow, and was 75% in loessland, far higher than that (18.8%) in sand loam paddy field. There were fifteen differential protein spots in *H. serrata* from the three different germplasm resources. All the protein spots of *H. serrata* from different germplasm resources had obvious abundance differences. **Conclusion** The loessland is more suitable for the growth of *H. serrata* under shadow by artificial cultivation. The *H. serrata* with the germplasm resource from Datian, Fujian province is used as high quality one during the introduction and domestication. The different germplasm resources of *H. serrata* could be identified according to the abundance differences in differential protein spots.

Key words: different germplasm resources; *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray); huperzine A; differential protein; introduction and domestication

蛇足石杉 *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trev. 为蕨类植物, 属石杉科 (Huperiaceae) 石杉属 *Huperzia* Bernh. 多年生草本植物, 其主要有效成

分石杉碱甲 (huperzine A, Hup A) 是一种高效、低毒、可逆并高选择性抑制乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的药物, 临床上用于治疗重症肌无力和早期阿尔茨海

收稿日期: 2013-05-13

作者简介: 林如辉, 副主任药师。

*通信作者 潘大仁, 教授, 博士生导师。E-mail: 545117397@qq.com

默病,且疗效显著^[1-3],但在蛇足石杉中的量只有万分之几至万分之十几^[4]。由于目前蛇足石杉栽培尚未成功^[5-6],化学合成也很难获得高纯度活性 Hup A^[7],因此 Hup A 的原料只能来源于储量有限的野生蛇足石杉,对野生蛇足石杉的引种驯化意义重大。

药用植物次生代谢产物是天然药物的主要先导物,次生代谢产物的量成为野生药用植物引种驯化的重要性状指标。然而,由于药用植物次生代谢产物不仅受到生态环境、栽培技术和加工条件等因素的影响,而且还受到不同种质资源的影响。当前,由于分子生物学的快速发展,分子鉴定技术越来越广泛应用于植物筛选种质资源^[8-12],但利用差异蛋白质组学在药用植物种质鉴定上鲜有报道。因此,本研究通过筛选次生代谢产物量高的优质种质资源,同时,采用蛋白质双向电泳技术,分析不同种质资源蛇足石杉差异蛋白,以期建立优质种质的分子鉴别方法,为确保优质种质资源质量稳定提供依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

不同种质蛇足石杉植株于当年 4 月上旬分别引种自福建大田县(以下简称大田)、三明市郊(以下简称三明)和漳州南靖县(以下简称南靖)海拔 400~1 100 m 的林下。选择株高基本一致的种苗,引种到福建农林大学设施网室中,当年 10 月中旬分析不同种质蛇足石杉茎叶 Hup A 量和差异蛋白。

1.2 主要仪器

5804 R 台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);酶标仪(BioTek 公司);PROTEAN IEF 等电聚焦槽和 Protean II XL cell(美国 Bio-Rad 公司);KQ-100 型超声波清洗器(昆山市超声食品有限公司);AL204 型电子天平(Mettler 公司);2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);211 型 pH 值调节仪(Hanna 公司)。

1.3 试剂

Hup A 对照品(质量分数>99%,上海融禾有限公司),色谱纯甲醇(Merk 公司),两性电解质、IPG 胶条、矿物油(美国 Bio-Rad 公司),CHAPS(Amresco 公司),低熔点琼脂糖、尿素、丙烯酰胺、过硫酸胺、碘乙酰胺、DTT、甘油、R-250、SDS(加拿大 BBI 公司),Bradford 蛋白质定量试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司)。其余药品为国产分析纯试剂。

2 方法

2.1 栽培方法

土质:山地黄土质或水田沙壤土。光照:遮阳和未遮阳处理。样品性状调查:不同种质资源蛇足石杉的成活率、孢子生长情况、生长状况。田间管理:定植时浇透水,以后每半月浇 1 次薄水,定植时增加有机肥。

2.2 不同种质资源蛇足石杉中 Hup A 的测定

2.2.1 总生物碱的提取 从山地黄土质的遮阴栽培地,分别随机取大田、三明、南靖 3 个不同种质资源蛇足石杉各 5 株,分离其不同药用部位(茎、叶),立即放入 60 °C 烘箱里烘干,粉碎,过 20 目筛。按文献方法^[5]进行 Hup A 的提取。

2.2.2 高效液相色谱条件 Waters C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.08 mol/L 醋酸铵缓冲液(30:70,调 pH 至 6.0 左右);体积流量 1 mL/min;检测波长 310 nm;柱温 30 °C;进样量 10 μL。

2.2.3 标准曲线的建立 在此色谱条件下,不同 Hup A 质量浓度与色谱峰有很好的线性关系,Hup A 的出峰时间为 7.245 min,并且在 4.96~39.68 μg 与峰面积呈良好的线性关系,线性关系为 $Y=2 \times 10^6 X-4 140.2$, $r=0.999 8$ 。

2.2.4 对照品溶液制备 取 Hup A 对照品 1.24 mg,用甲醇定容至 25 mL,质量浓度为 49.6 mg/L,再取出 1 mL,用甲醇定容至 10 mL,配制成二级溶液质量浓度为 4.96 mg/L 的对照品溶液。

2.2.5 精密度试验 取 4.96 mg/L Hup A 对照品溶液,在色谱条件下重复进样 6 次,Hup A 峰面积的 RSD 值为 0.57%。

2.2.6 稳定性试验 取供试品溶液,每隔 2 h 测定 1 次,连续进样 6 次,记录 Hup A 的质量分数的变化,Hup A 质量分数的 RSD 为 0.40%。

2.2.7 加样回收率试验 精密称取千层塔药材(蛇足石杉全草)细粉 6 份,每份 0.5 g,分别加入 6 μg/mL 对照品溶液 60 mL,按样品制备方法和色谱条件进行测定,计算回收率。Hup A 加样回收率为 99.94%,RSD 为 1.46%。

2.3 双向电泳分析不同种质资源蛇足石杉的蛋白质

2.3.1 蛋白质蛇足石杉提取 茎和叶鲜品 100 mg,剪碎后加入 10 mg 聚乙烯吡咯烷酮(PVP-40)及少量石英砂,用液氮研磨成粉。加入样品体积 3 倍的 10%三氯乙酸(丙酮配制,含 10 mmol/L 即 0.07% β-巯基乙醇),混匀,-20 °C 沉淀过夜,4 °C,15 000

r/min 离心 15 min, 弃上清。沉淀复溶于等体积的冷丙酮 (含 10 mmol/L β -巯基乙醇), $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沉淀 1 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 000 r/min 离心 15 min, 弃上清。沉淀复溶于 80%丙酮 (含 10 mmol/L β -巯基乙醇), 离心所得沉淀低温冷冻真空抽干。

2.3.2 蛋白质裂解 每毫克干粉加入 20 μL 裂解液 (7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% 3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸, 50 mmol/L 二巯基苏糖醇, 0.2% Bio-Rad 载体两性电解质), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min, 期间搅动几次, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 16 000 r/min 离心 15 min, 上清用 Bradford 法定量后 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.3.3 蛋白质定量 按照生工 Bradford 法蛋白定量试剂盒说明书进行蛋白质定量。取 4 μL 蛋白对照品加 PBS 稀释至 100 μL , 使终质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 将稀释后的对照品按 0、1、2、4、6、8、10、15 μL 分别加到 96 孔板中, 加 PBS 补足到 20 μL , 每孔蛋白量分别为 0、0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、3.0 μg ; 加适当体积样品到 96 孔板的样品孔中, 加 PBS 使总体积达 20 μL ; 各孔加入 200 μL Bradford 试剂, 混匀, 室温放置 5 min; 用预热的酶标仪测定 595 nm 处吸光度 (A_{595}) 值; 绘制标准曲线, 计算样品中的蛋白浓度。双向电泳: 按文献方法^[7]进行操作。

3 结果与分析

3.1 引种适应性研究

3.1.1 不同种质资源蛇足石杉引种移栽成活率 蛇足石杉对生长环境条件要求比较严格, 不同引种地区蛇足石杉植株移栽成活率有较显著的差异, 其中以大田蛇足石杉移栽成活率最高, 达 65.5%。而南靖蛇足石杉移栽成活率最低, 仅达 14.3%, 且长势不良。原因可能是南靖蛇足石杉生长条件偏更潮湿温暖, 大田与三明引种地的条件相对比较干燥冷凉。成活率与移植地的纬度也可能有关, 大田的纬度 (北纬 $25^{\circ}29'$ ~ $26^{\circ}09'$) 与福州 (北纬 $25^{\circ}15'$ ~ $26^{\circ}39'$) 最接近。

3.1.2 蛇足石杉引种移栽遮阳效果 蛇足石杉植株于当年 4 月移栽于福建农林大学设施基地网室内, 用双层遮阳网分遮阳与未遮阳处理。结果表明, 遮阳处理的蛇足石杉成活率高达 77.8%, 而未遮阳的成活率只有 7.1%, 相差 10 倍多。表明蛇足石杉是喜阴的药用植物, 人工栽培时, 应该给予蛇足石杉野生环境——足够的荫蔽程度。

3.1.3 不同土壤对蛇足石杉的移栽效果 蛇足石杉引种在不同的土壤中, 结果可见, 黄土地栽培成活率高, 为 75.0%, 长势良好; 水田土壤成活率为

18.8%, 长势不良。因此, 人工栽培时, 土壤选择以黄土为佳, 并需要给予必要的遮阳; 种质来自福建大田的蛇足石杉引种适应性更强。

3.2 蛇足石杉中 Hup A 的测定结果

不同种质资源蛇足石杉茎、叶中 Hup A 的量结果见表 1。3 个不同种质资源蛇足石杉茎中的 Hup A 量均大于叶片中的量, 几乎为叶的 3 倍, 而且叶片和茎的量都是大田 > 三明 > 南靖, 相互之间都达到了极显著差异水平。种质来自南靖的植株, 其 Hup A 量小于其他来源地植株, 原因可能是植株引种后生长不良, 植株长势不佳影响了 Hup A 的量。

表 1 不同种质资源蛇足石杉叶和茎中 Hup A 的质量分数 ($n=6$)

来源	叶片 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	茎 / ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
大田	87.54 \pm 1.51 aA	197.80 \pm 2.34 aA
三明	58.52 \pm 1.01 bB	185.14 \pm 2.21 bB
南靖	55.76 \pm 0.98 cC	148.58 \pm 2.06 cC

小写字母为显著水平 ($P < 0.05$), 大写字母为极显著水平 ($P < 0.01$)
Lowercase letters mean significant difference ($P < 0.05$) and uppercase letters means very significant differences ($P < 0.01$)

3.3 不同种质蛇足石杉蛋白表达差异分析

3.3.1 不同种质蛇足石杉的蛋白质双向电泳图谱分析 利用蛋白质双向电泳分析了不同种质蛇足石杉的蛋白质表达谱, 获得了 3 个蛇足石杉双向电泳图谱 (图 1~3)。利用 Imagemaster 2D Elite 5.0 图像分析软件对这 3 个不同产地蛇足石杉植株的电泳图谱进行分析, 经软件自动检测结合人工去除, 分别保留 267、258、473 个高清晰且重复性强的蛋白质点, 同时对 3 个不同种质资源蛇足石杉蛋白质点的表达丰度 (由软件根据蛋白质点的相对体积自动生成的数量值) 进行差异检测, 共得到 15 个差异蛋白质点 (图 1 和图 4),

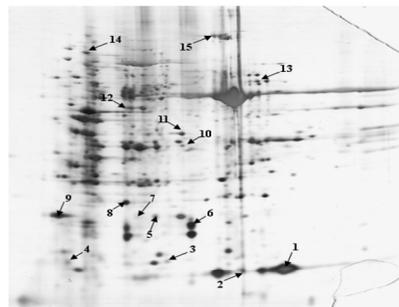


图 1 采自大田蛇足石杉植株的蛋白质表达电泳图谱
Fig. 1 2-DE gel electrophoresis of protein expression in *H. serrata* from Datian germplasm resource

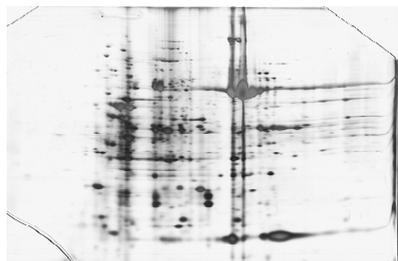


图 2 采自三明蛇足石杉植株的蛋白质表达电泳图谱

Fig. 2 2-DE gel electrophoresis of protein expression in *H. serrata* from Sanming germplasm resource

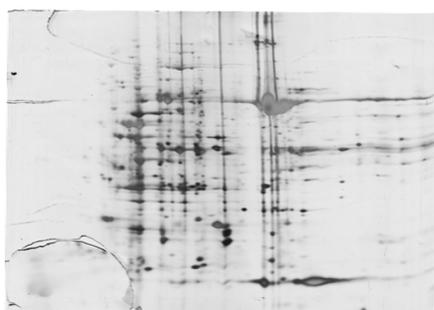


图 3 采自南靖蛇足石杉植株的蛋白质表达电泳图谱

Fig. 3 2-DE gel electrophoresis of protein expression in *H. serrata* from Nanjing germplasm resource

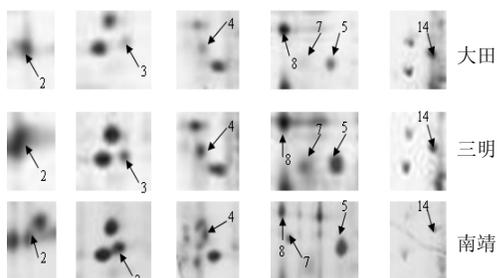


图 4 不同种质资源蛇足石杉差异蛋白质点

Fig. 4 Differential protein spots in *H. serrata* from different germplasm resources

并对差异蛋白质点进行标注。

3.3.2 不同种质资源蛇足石杉差异表达蛋白质点表达丰度 从 3 个不同种质资源蛇足石杉差异表达蛋白质点表达丰度来看 (图 5), 在 15 个差异蛋白质点中, 2、4、7、11 在大田植株的表达丰度最高; 3、5、8、14、15 在三明植株中的表达丰度最高; 而其他 6 个点在南靖植株中的表达丰度最高。可见, 生长在不同产地的蛇足石杉, 其蛋白质表达量存在着一定的差异。

4 讨论

蛇足石杉是珍稀的名贵药材, 具有多种药用功

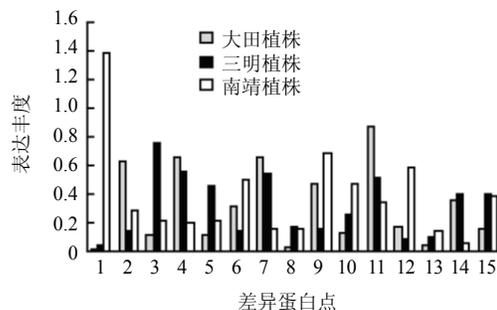


图 5 不同种质资源蛇足石杉差异表达蛋白质点表达丰度
Fig. 5 Expression abundance of differential proteins in *H. serrata* from different germplasm resources

效, 可用来治疗阿尔茨海默症、治疗重症肌无力和小儿麻痹症, 有提高青春期学生的记忆和学习成绩等功效。但是蛇足石杉不易引种栽培, 本研究通过对采自福建大田县、三明市郊和南靖县 3 个不同种质资源的蛇足石杉的适应性栽培和引种驯化, 结果指出, 因蛇足石杉为喜阴、喜湿植物, 较高的荫蔽度和较高的湿度环境有利于其生长。湿度较高, 植株长势健壮, 株高 20 cm 以上, 生长发育快、小孢子数多, 而湿度较低, 则长势较弱, 株高约 10~15 cm, 生长发育迟缓、小孢子数稀少。腐殖层较厚的沙壤较有利于蛇足石杉的生长。人工引种栽培时, 土壤选择以黄土质为佳, 并需要给予必要的遮阳; 种质资源来自大田的蛇足石杉适应性较强, 植株长势好, 且 Hup A 量也较高。以上方法可以为蛇足石杉产业化引种栽培奠定技术基础。

差异蛋白质组学在药用植物种质鉴定鲜有报道, 利用双向凝胶电泳技术对 3 个不同种质资源的蛇足石杉进行了差异蛋白表达分析, 共得到 15 个差异蛋白质点, 不同种质资源蛇足石杉的差异蛋白质点丰度差异较大, 可用于不同种质资源蛇足石杉种质鉴别。

从蛇足石杉叶和茎中 Hup A 量分析与差异蛋白质组学来看, 种质资源的产地生态条件影响了 Hup A 的量, 同时这种影响表现在蛋白质分子水平上的差异。本研究指出, 引自福建省大田县的蛇足石杉 Hup A 的量相比最高, 而表现在 2、4、7、11 4 个蛋白差异点表达丰度最高。进一步对蛇足石杉蛋白差异点研究, 将对揭示蛇足石杉 Hup A 量的基因调控奠定基础。

参考文献

[1] Ma L, Wu F A. Chinese traditional drug which can enhance the memory retention *Huperzia serrata* [J].

- Plant*, 2000(3): 151.
- [2] 王子文, 张航向, 任平. 哈伯因治疗阿尔茨海默病的临床对比研究 [J]. 医学信息, 2000, 13(8): 462.
- [3] 马英姿, 张慧, 宋荣, 等. 高温胁迫对蛇足石杉生理特性的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(2): 224-228.
- [4] 袁经权, 周小雷, 王硕, 等. 蛇足石杉化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 399-407.
- [5] Ma X Q, Tan C H, Zhu D Y, *et al.* A survey of potential huperzine A natural resources in China: The Huperziaceae [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 104: 54-67.
- [6] 王德立, 齐耀东, 冯锦东. 海南蛇足石杉天然居群结构与生境因子研究 [J]. 南方农业学报, 2011, 42(10): 1241-1244.
- [7] 顾月华, 吴庆庆. 高效液相色谱法测定蛇足石杉中石杉碱甲的含量 [J]. 中国药理学通报, 2005, 21(8): 1017-1018.
- [8] 任德权, 周荣汉. 中药材生产质量管理规范 (GAP) 实施指南 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [9] 夏至, 李贺敏, 张红瑞, 等. 紫苏及其变种的分子鉴定和亲缘关系研究 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 1027-1032.
- [10] 李立武. 植物叶片蛋白质的双向电泳分析 [J]. 植物学通报, 1989, 6(4): 248-250.
- [11] 赵爽, 黄春球, 杨耀文, 等. 黄花白及的 SCAR 分子标记转化研究 [J]. 中草药, 2012, 43(10): 2036-2039.
- [12] 张少斌, 刘惠. 双向电泳技术在植物蛋白质组研究中的应用 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(10): 2049-2050.