

党参种子真实性鉴定研究[△]

苏宁宁, 张丽萍*

(中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所,
中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193)

[摘要] **目的:** 研究党参种子真实性鉴别方法, 为党参种子品种鉴定以及党参种子质量标准的制定提供依据。**方法:** 对不同来源党参分别进行了种子蛋白的 SDS-PAGE 电泳, 子叶蛋白的 SDS-PAGE 电泳, 子叶蛋白的非变性凝胶电泳。**结果:** 三种电泳结果显示, 种子蛋白的 SDS-PAGE 电泳, 谱带清晰, 分离到的差异谱带多; 子叶蛋白的 SDS-PAGE 电泳, 谱带模糊; 子叶蛋白的 PAGE 电泳, 谱带虽然清晰但是没有分离到有差异的谱带。**结论:** 党参种子真实性鉴定应选择种子蛋白的 SDS-PAGE 电泳, 通过电泳分析得到陕西凤县, 甘肃文县, 四川野生的亲缘关系比较近, 比其他地方的党参种子多出一条 R_f 值大约为 0.060 的谱带, 根据 Marker 蛋白谱带可以初步推断这个差异蛋白的分子量为 170 KDa。

[关键词] 党参; 真实性鉴别; 电泳方法

Study on Seed Genuineness Identification of *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf

SU Ningning, ZHANG Liping*

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peiking Union Medical College;
Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine,
Ministry of Education, Beijing 100193, China)

[Abstract] **Objective:** To provide the basis for variety identification and seed standards of *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf through researching seeds genuineness identification methods. **Methods:** *Codonopsis pilosula* seeds protein SDS-PAGE electrophoresis, cotyledonary protein SDS-PAGE electrophoresis and cotyledonary protein PAGE electrophoresis from different area were analyzed. **Results:** The results of three different electrophoresis methods displayed: the bands of seeds protein SDS-PAGE electrophoresis were clearness and the different bands isolated from electrophoresis were much more. The bands of cotyledonary protein SDS-PAGE electrophoresis were fuzzy. Though the bands of cotyledonary protein PAGE electrophoresis were very clearness, there was no difference band isolated from the way of electrophoresis. **Conclusion:** Seeds' protein SDS-PAGE electrophoresis was chose to verify the genuineness of *Codonopsis pilosula*. The genetic relationship among seeds from Fengxian in Shanxi, Wenxian in Gansu and Aba in Sichuan provinces were close. The molecular weight of distinct protein was 170 KDa.

[Key words] *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf; Genuineness identification; Electrophoresis

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2014.01.008

党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf 为桔梗科 Campanulaceae 多年生草本植物。现代药理研究表

明, 党参具有调节血糖, 促进造血, 降压, 抗缺氧, 耐疲劳, 增强机体免疫力, 调节胃肠收缩及抗溃疡

[△] [基金项目] 国家科技重大专项中药材种子种苗和种植标准平台 (2012ZX09304006)

* [通信作者] 张丽萍, 研究员, 研究方向: 中药材规范化种植, Tel: (010) 62899743, E-mail: LPzhang@implad.ac.cn

等多种作用。2010 年版《中国药典》规定正品党参为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.、素花党参 *Codonopsis pilosula* Nannf. var. *modesta* (Nannf.) L. T. Shen 和川党参 *Codonopsis tangshen* Oliv. 的干燥根^[1], 这 3 种党参种子均属小粒种子, 大小、形状、颜色极其相近^[2]。在生产中, 这 3 种种子极易混淆, 给党参生产和正确评定种子等级带来很大麻烦。本研究采用种子蛋白的 SDS-PAGE 电泳, 子叶蛋白的 SDS-PAGE 电泳, 和子叶蛋白的非变性凝胶电泳 3 种不同的方法对党参种子真实性进行研究, 得出最适合党参种子真实性鉴定所用的方法, 从而为党参种子品种鉴定以及党参种子质量标准的制定提供重要依据。

1 材料

1.1 种子来源

分别于 2012 年 11 月份在山西, 四川, 甘肃, 陕西共收集栽培种子 6 份, 材料来源及其编号见表 1。

表 1 种子来源及编号

编号	材料来源
27	山西平顺县东寺头乡焦底村
36	甘肃岷县梅川镇底固村
43	甘肃临洮县玉井镇陈家嘴村上街
44	四川阿坝小金县
A	陕西凤县
B	甘肃文县

依据文献和植物志对党参属植物的形态分类以及各种质的外部形态特征, 鉴定 27 号(山西平顺县东寺头乡焦底村, 以下简称山西平顺)、36 号(甘肃岷县梅川镇底固村, 以下简称甘肃岷县)及 43 号(甘肃临洮县玉井镇陈家嘴村上街, 以下简称甘肃临洮)为党参; 44 号(四川阿坝小金县, 以下简称四川野生)为野生川党参; A(陕西凤县), B(甘肃文县)为素花党参。

1.2 仪器

电泳仪, 酶标仪, 移液枪, 染色摇床, 脱色摇床, 研钵, 低温离心机等

1.3 试剂

(1) 提取液的配制: 1 mol·L⁻¹ Tris-HCl (PH 7.6)/500 μL; 5 mol·L⁻¹ NaCl/200 μL; 10% Np40/

100 μL; 30% 甘油/3.33 μL; 1mmol·L⁻¹ DTT/13.5 μL; Protain Inhibitor (罗氏生产)/100 μL; 双蒸 H₂O/5.4 mL。

(2) 10% 分离胶: 重蒸 H₂O/5.9 mL; 30% Acr-Bis(29:1) (Bio-Rad)/5.0mL; 1.5 mol·L⁻¹ Tris-HCl (PH 8.8)/3.8 mL; 10% SDS/150μL; 10% 过硫酸铵/150 μL; TEMED/6 μL。

(3) 5% 浓缩胶 5 mL: 重蒸 H₂O/5 mL; 30% Acr-Bis(29:1) (Bio-Rad)/3.4 mL; 1.0 mol·L⁻¹ Tris-HCl (PH 6.8)/830 μL; 10% SDS/50 μL; 10% 过硫酸铵/50 μL; TEMED/5μL。

(4) 电极缓冲液: Tris 3.03 g, 甘氨酸 14.4 g, SDS 1.0 g, 溶于 H₂O 中, 定容至 1 000 mL。

(5) 上样缓冲液: 250 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 10% SDS, 0.5% 溴酚蓝, 50% 甘油, 375 mmol·L⁻¹ DTT。

(6) 染色液: 45% 甲醇, 10% 乙酸, 0.1% 考马斯亮蓝 R-250

(7) 脱色液: 25% 甲醇, 10% 乙酸

(8) Marker 蛋白(康为试剂)

2 方法与结果

2.1 种子全蛋白的 SDS-PAGE 凝胶电泳

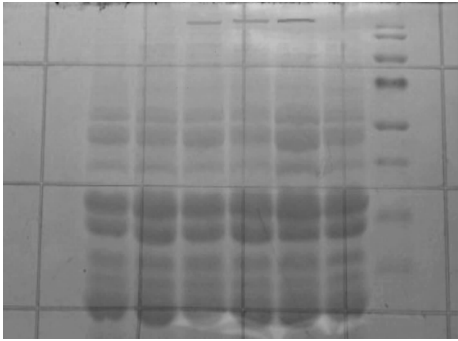
2.1.1 样品制备: 用液氮快速磨碎种子, 将种子粉末加在样品管内后, 放入 100 μL 提取液, 置于冰上 30 min。然后将样品管于 4 ℃ 的低温离心机中, 以 13000 r/min 的速度离心 15 min, 直至提取液没有浑浊取上清, 将样品提取液在 100 ℃ 下变性 5 min, 并经酶标仪定量使其浓度达到 7.5 μg·μL⁻¹。

2.1.2 电泳操作: 按上样缓冲液: 上清液(1:5) 的比例, 在样品管中加入适量缓冲液。然后用微量上样器吸取样品 20 μL, Marker 蛋白 5 μL, 注入样品槽。最后加入电极缓冲液开始电泳, 开始电压为 80V, 待样品进入分离胶后将电压调至 120V, 待指示剂行至距离底部 0.5 ~ 1 cm 时, 关闭电源, 停止电泳。

2.1.3 染色与脱色: 将胶板浸于考马斯亮蓝 R250 染色液中染色 1 ~ 2 h, 至谱带清晰。染色后用水冲去凝胶表面附着的染料, 用脱色液脱色, 直至背景清晰。

2.1.4 重现性: 同样的试验重复 5 次, 其电泳结果如图 1。

2.1.5 结果分析: 不同党参种子间的差异主要体现在谱带数和泳动率上。泳动率(R_f) 公式: R_f = 样品



注：图中由左至右依次为，27(山西平顺)，36(甘肃岷县)，A(陕西凤县)，B(甘肃文县)，44(四川野生)，43(甘肃临洮)以及 Marker。

图 1 种子蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱

谱带泳动距离 / 溴酚蓝前沿泳动距离(见表 2)。

表 2 样品泳动率

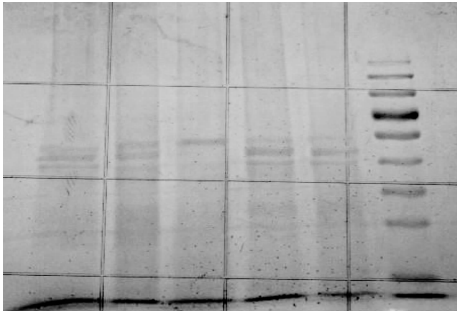
谱带号	27	36	A	B	44	43
1	—	—	0.060	0.059	0.059	—
2	0.286	0.287	0.285	0.286	0.285	0.286
3	0.357	0.358	0.357	0.357	0.357	0.358
4	0.429	0.429	0.428	0.429	0.428	0.429
5	0.548	0.550	0.547	0.549	0.548	0.547
6	0.619	0.619	0.618	0.618	0.619	0.618
7	0.680	0.682	0.679	0.681	0.680	0.681
8	0.738	0.737	0.738	0.738	0.738	0.737
9	0.857	0.856	0.855	0.856	0.855	0.856

注：“—”表示没有谱带。

通过 5 次重复试验，发现每次试验均是 A(陕西凤县)，B(甘肃文县)，44 号(四川野生)，比别的地方的党参多出一条 R_f 值大约为 0.060 的谱带，根据旁边的 Marker 蛋白谱带可以初步推断这个差异蛋白的分子量在 170 KDa 左右，而且 44 号(四川野生)这条谱带要比其他两个种子的颜色要深。根据亲缘关系较近的种，遗传物质分歧不大，其蛋白质组成就愈相近^[3-4]的道理，推断 44 号、A 及 B 这 3 类种子亲缘关系更近。根据谱带越多，品系越进化，适应环境能力越强，可以推断这 3 类种子适应环境能力较强。

2.2 子叶中蛋白质的 SDS-PAGE 电泳

将种子于温度 20 ℃，光照 2 400 lx，纸床条件下，培养 16 天，剪下刚萌发的幼嫩子叶，放入液氮迅速磨碎，加入样品提取液，通过高速离心从中提取样品蛋白。经酶标仪定量，使其样品浓度达到 7.5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 后经过电泳，染色，脱色，5 次重复性试验(步骤和方法同 2.1 项下)，最后得到电泳结果见图 2，经计算，其样品泳动率见表 3。



注：图中由左至右依次为，27 号(山西平顺)，44 号(四川野生)，A(陕西凤县)，36 号(甘肃岷县)，B(甘肃文县)，Marker。

图 2 子叶蛋白 SDS-PAGE 电泳图

表 3 样品泳动率

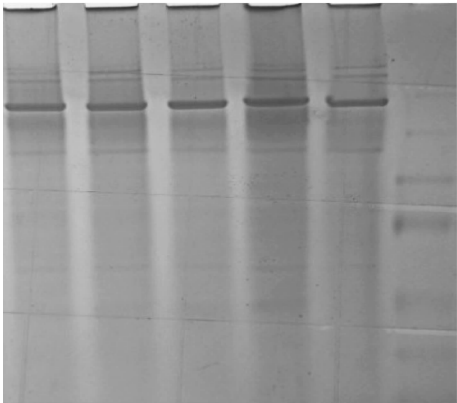
谱带号	27	44	A	36	B
1	0.493	0.494	0.492	0.493	0.493
2	0.534	0.534	—	0.535	0.534
3	0.561	0.562	—	0.563	0.562

注：“—”表示没有谱带。

子叶中蛋白质电泳图没有种子蛋白质电泳图清晰，可能由于种子中蛋白质表达量更高，经过 5 次重复试验，发现 A(陕西凤县)没有第 2，3 条谱带，通过 Marker 对比得到，它与其他种党参的差异蛋白分子量介于 55 KDa ~ 43 KDa 之间。

2.3 子叶中蛋白质的非变性凝胶电泳

其样品蛋白也是来源于刚萌发的幼嫩子叶。经过酶标仪定量使其浓度达到 7.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ，样品蛋白提出来之后去除高温变性的步骤。在配制浓缩胶，分离胶，上样缓冲液，和电极液时，分别去除里面的 SDS 成分。样品经过电泳，染色，脱色，5 次重复性试验之后，得到的电泳结果见图 3，经计算，其样品泳动率见表 4。



注：图中由左至右依次为，27 号(山西平顺)，44 号(四川野生)，A(陕西凤县)，36(甘肃岷县)，B(甘肃文县)，Marker。

图 3 子叶蛋白的非变性凝胶电泳

表 4 样品泳动率					
谱带号	27	44	A	36	B
1	0.120	0.121	0.120	0.122	0.120
2	0.152	0.151	0.154	0.152	0.153
3	0.207	0.208	0.207	0.206	0.207
4	0.293	0.294	0.295	0.294	0.293
5	0.533	0.534	0.533	0.535	0.533

从子叶蛋白的非变性凝胶电泳来看，各地种子在图谱上并没有出现差异性，可能的原因是，胶版不够大，以至于蛋白质没有完全分开。

3 讨论

真实性鉴定是种子生产工作中不可缺少的重要步骤，是保证良种优良遗传性充分发挥，促进农业生产持续稳产、高产的有效措施；是正确评定种子等级，贯彻优种优价政策的主要依据^[5-7]。蛋白质电泳鉴定是种子真实性鉴定的一种常用的方法，其理论依据是蛋白质为结构基因编码的标记，通过分析足够多的蛋白质标记就可以涉及大量的基因组^[8,9]。植物品种是由各种不同遗传表现的种质集合体组成，所以对这些集合体中的蛋白质或酶进行比较，就能用来描述这些材料的特征。而电泳正好提供了一种进行这种比较的绝好方法^[10]。

本文对 3 种不同的蛋白质电泳方法进行研究，结果表明：种子蛋白的 SDS-PAGE 电泳谱带清晰，分离到的差异谱带多；子叶蛋白的 SDS-PAGE 电泳谱带模糊；子叶蛋白的 PAGE 电泳谱带虽然清晰，但是没有分离到有差异的谱带。综合以上分析，建议选择种子蛋白的 SDS-PAGE 电泳作为党参真实性鉴别的方法。

通过种子蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱分析得到：A(陕西凤县)，B(甘肃文县) 及 44 号(四川野生) 的亲缘关系比较近，它们差异蛋白的分子量在 170 KDa 左右。

种子蛋白的 SDS-PAGE 电泳方法操作简单，效率高，可以用作党参种子真实性鉴别的方法，为减少生产中品种混杂，并为党参种子品种鉴定以及质量标准的制定提供重要依据。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 199.

[2] 陈瑛. 实用中药种子技术手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999.

[3] 聂刘旺, 张定成. 安徽产石蒜属植物三种酶同工酶的分析[J]. 生物学杂志, 2003, 2: 27-29.

[4] 颜启传. 种子检验原理和技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2001: 102-103.

[5] 郑伟华, 王富兰, 陈贺. 甜瓜种子蛋白多态性与品种纯度快速鉴定方法研究[J]. 种子, 2010, 29(11): 93-94.

[6] 邢丹, 王文全, 于福来, 等. 知母种子质量检验方法研究[J]. 中国现代中药, 2011, 13(5): 23-26.

[7] 郭巧生, 张贤秀, 王艳茹, 等. 夏枯草种子品质检验及质量标准初步研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(7): 815.

[8] 刘杨, 李峰, 谭颖, 曹旭峰. 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴别女贞子与日本女贞子[J]. 山东中医杂志, 2010, 29(5): 339-340.

[9] 何忠效, 张树政. 电泳[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1999: 37-39, 133-137.

[10] 夏其昌, 张祥民, 周仲驹, 等. 蛋白质电泳技术指南[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 22.

(收稿日期 2013-05-12)