

· 问题探讨 ·

蒙古黄芪2种表型种子的可溶性蛋白电泳分析

谢小龙^{1,2}, 李毅²

(1. 河南中医学院药学院, 河南 郑州 450046; 2. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008)

Analysis of Soluble Proteins in Two Seed Phenotypes of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* by Polyacrylamide Gel Electrophoresis

XIE Xiao-long^{1,2}, LI Yi²

摘要:采用聚丙烯酰胺电泳技术,对蒙古黄芪有纹和无纹2种表型种子进行可溶性蛋白电泳分析,以探测二者在遗传上的差异。结果表明,2种表型种子产生的34条可溶性蛋白电泳谱带中,25条为共有谱带,其中8条谱带在2种表型种子中着色强度不同;9条为多态性谱带,无纹种子和有纹种子各具有2条和7条特异性谱带。可见,蒙古黄芪2种表型种子在遗传上存在分化。

关键词: 蒙古黄芪; 种子; 可溶性蛋白电泳; 遗传分化

中图分类号: S567 **文献标志码:** A

文章编号: 1001-4705(2013)02-0067-02

黄芪为临床常用中药,具有补气升阳,固表止汗,利水消肿,生津养血,行滞通痹,托毒排脓,敛疮生肌等功效^[1]。由于野生资源的锐减,人工栽培成为提供商品黄芪的主要途径。甘肃省陇西县是黄芪的道地产区,在长期的栽培过程中,该地蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 出现了丰富的变异,存在不同的形态类型^[2]。调查表明,红色类型和绿色类型是其中性状差异显著的2个形态类型,其各自的成熟种子在表型上亦存在明显差异;红色类型蒙古黄芪绝大部分植株所产的种子表面均具斑纹即为有纹种子,而绿色类型所有植株的种子均无斑纹即为无纹种子。

蛋白质是基因的产物,具有特异性、稳定性和不易受环境影响等优点,因而是植物分类和演化、品种鉴定、遗传分化以及中药材真伪品鉴别等方面研究的重要生化标记^[3-6]。本试验通过聚丙烯酰胺凝胶电泳技术研究蒙古黄芪有纹种子和无纹种子在可溶性蛋白图谱上的异同,以探测2种表型种子是否在遗传上分化。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 种子采集

于甘肃省陇西县首阳镇下河社蒙古黄芪栽培大田选取典型红色类型和绿色类型植株,分别采集各类型植株的成熟果荚,红色类型植株所产种子均为有纹种子,绿色类型植株所产种子均为无纹种子。净种并自然风干后,分别将2种表型种子装入纸袋备用。

1.1.2 主要仪器

DYY-III12 B型电泳仪(北京六一仪器厂),DYY-III28 A型电泳槽(北京六一仪器厂),Sigma 2 k 15型冷冻离心机(德国Sigma公司),JA 2003千分之一电子天平(上海方瑞仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 可溶性蛋白样品的制备

纯净蒙古黄芪种子经75%乙醇消毒10 min后,蒸馏水反复冲洗3次,将水吸干,压碎并混和均匀。称取0.5 g种子粉末,加入5 mL提取液(0.12 mol/L Tris-HCl溶液,pH=6.7),冰浴研磨匀浆,0~4℃冰箱中浸提10 h,在Sigma-2 k 15冷冻离心机中于4℃条件下以4 500 r/min离心15 min,取2次离心上清液,加入等体积样品缓冲液^[7],摇匀即为可溶性蛋白样品。

1.2.2 可溶性蛋白电泳

采用不连续聚丙烯酰胺小型垂直板凝胶电泳。分离胶浓度12.5%,浓缩胶浓度4%,电极缓冲液为This-甘氨酸,pH=8.3^[8]。每槽进样50 μL,4℃条件下稳流电泳,初始电流强度20 mA,样品进入分离胶后,电流调至30 mA,当溴酚蓝指示剂到达分离凝胶底部约1 cm时停止电泳。取出胶板,蒸馏水冲洗后浸入0.25%考马斯亮蓝R 250溶液中^[9],室温下染色1 h。冲去胶板表面的染料,将其浸于脱色液中^[10],室温下脱色24 h至背景清晰,拍照记录。

收稿日期:2012-11-25

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(编号:2007BAD64B04);“十二五”国家科技支撑计划项目(编号:2011BAI06B02);河南中医学院“博士科研基金”项目(编号:BSJJ2009-30)。

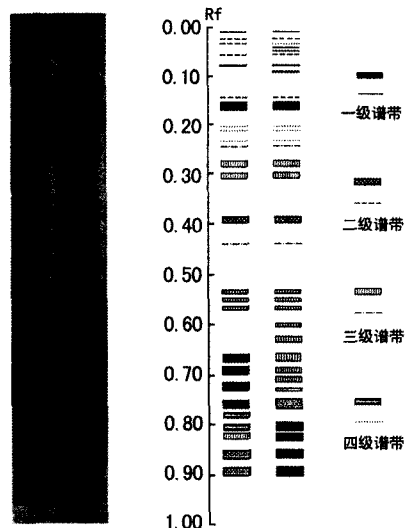
作者简介:谢小龙(1976-),男,河南武陟人;博士,讲师,主要从事药用植物资源相关研究;E-mail: xiaolongxie@126.com。

1.2.3 蛋白谱带位置的标定

计算各谱带的 Rf 值 (Rf = 谱带迁移距离/指示剂迁移距离) 标定谱带位置。

2 结果与分析

蒙古黄芪 2 种表型种子共产生出 34 条可溶性蛋白电泳谱带, 其中无纹种子具 27 条, 有纹种子具 32 条 (图 1 和表 1)。2 种表型种子的共有谱带 25 条, 占总谱带的 73.53%, 表明二者在遗传上的相似性; 但在共有谱带中, 有 8 条谱带在 2 种表型种子中着色强度不同, 其中 Rf 0.036, Rf 0.667, Rf 0.692, Rf 0.759 等在无纹种子中分别为 1 级谱带或 2 级谱带, 在有纹种子中则分别为 3 级谱带或 4 级谱带, 而 Rf 0.805, Rf 0.825, Rf 0.860, Rf 0.893 等在无纹种子中为 3 级谱带或 4 级谱带, 在有纹种子中则均为 1 级谱带。在所产生谱带中, 多态性谱带 9 条, 占总谱带的 26.47%; 其中 Rf 0.723 和 Rf 0.783 为无纹种子的特异性谱带, 而 Rf 0.043, Rf 0.050, Rf 0.094, Rf 0.601, Rf 0.630, Rf 0.711, Rf 0.731 等 7 条谱带则为有纹种子的特异性谱带。多态性谱带以及共有谱带的着色强弱不同, 表明 2 种表型种子在遗传上发生了分化。



A 图和 B 图中左为无纹种子, 右为有纹种子

图 1 蒙古黄芪 2 种表型种子可溶性蛋白电泳谱带图 (A) 及模式图 (B)

3 结论与讨论

蛋白质作为基因的产物, 其变异能够反映植物在遗传上的变异。本实验中, 蒙古黄芪 2 种表型种子在可溶性蛋白电泳图谱上存在明显的差异, 表明二者在遗传上存在分化, 因而通过隔离授粉和人工选择等措施, 可以使同一表型的种子在遗传上进一步纯化, 为黄芪育种增加遗传素材。

表 1 蒙古黄芪 2 种表型种子可溶性蛋白电泳谱带位置及分级

序号	Rf 值	谱带级别		序号	Rf 值	谱带级别	
		无纹种子	有纹种子			无纹种子	有纹种子
1	0.012	1	1	18	0.441	3	3
2	0.027	2	2	19	0.536	3	3
3	0.036	2	4	20	0.551	3	3
4	0.043	—	1	21	0.570	3	3
5	0.050	—	1	22	0.601	—	3
6	0.059	2	2	23	0.630	—	3
7	0.079	1	1	24	0.667	1	3
8	0.094	—	1	25	0.692	1	3
9	0.142	2	2	26	0.711	—	3
10	0.166	1	1	27	0.723	1	—
11	0.205	4	4	28	0.731	—	4
12	0.214	4	4	29	0.759	1	4
13	0.234	4	4	30	0.783	4	—
14	0.245	3	3	31	0.805	4	1
15	0.280	3	3	32	0.825	3	1
16	0.304	3	3	33	0.860	4	1
17	0.391	2	2	34	0.893	4	1

闫冲等^[6]曾利用种子蛋白电泳技术对蒙古黄芪、膜荚黄芪、扁茎黄芪和紫花苜蓿等 4 个物种的种子进行了有效鉴别。本实验结果表明, 蒙古黄芪的有纹和无纹 2 种表型种子在蛋白电泳图谱上亦有显著区别, 因而种子蛋白电泳技术可能是研究蒙古黄芪种下变异和品种鉴定的一种有效方法。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 年版 (一部) [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 283 - 284.

[2] 谢小龙, 王溪森, 赵利, 等. 陇西栽培蒙古黄芪原植物形态多样性研究 [J]. 安徽农业科学, 2004, 32(6): 1 203 - 1 204.

[3] Ladizinsky G. and Hymowitz T. Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies [J]. Theor Appl Genet, 1979, 54: 145 - 151.

[4] Hussain A., Ramirez H., Bushuk W., et al. Field bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar identification by electrophoregrams of cotyledon storage proteins [J]. Euphytica, 1986, 35: 729 - 732.

[5] Baranger A., Aubert G., Arnau G., et al. Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein- and PCR-based markers [J]. Theor Appl Genet, 2004, 108: 1 309 - 1 321.

[6] 闫冲, 聂凤, 白楠. 安国地产黄芪及混淆品种的种子蛋白质电泳鉴别 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(4): 289 - 290.

[7] 谢小龙, 胡延萍, 赵旭东, 等. 陇西栽培蒙古黄芪酯酶同工酶数量分析 [J]. 中国科学院研究生院学报, 2007, 24(4): 525 - 529.

[8] 何忠效, 张树政 主编. 电泳 (第 2 版) [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 281.

[9] 袁晓华, 杨中汉 主编. 植物生理生化试验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1983: 57 - 65.

[10] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴 编. 植物生理学实验 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1990: 193 - 199.