

不同产地人参中水溶性蛋白质含量的差异性研究

白雪媛, 赵雨*, 张惠, 王思明, 李晓华(长春中医药大学, 长春 130117)

摘要: 目的 针对长白山区 15 个不同产地人参中水溶性蛋白成分的含量进行比较研究, 以鉴别人参质量的地域性差别。方法 采用 SDS-PAGE 获得人参中水溶性蛋白的电泳胶片, 通过凝胶成像软件将胶片转化成浓度-比移值图谱, 累计叠加不同产地的谱图, 比较分析不同条带的浓度变化情况。结果 不同产地人参中水溶性蛋白的 SDS-PAGE 电泳谱带条数无明显差别, 主要谱带为 13 条, 但因浓度的不同而引起的谱带的指纹信息差异较大。结论 人参水溶性蛋白的含量在不同产地间存在差异, 与地域性密切相关。

关键词: 人参; 不同产地; 水溶性蛋白; 聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2012)11-0980-04

Differences Study of Water-soluble Protein Content in Ginseng from Different Origins

BAI Xueyuan, ZHAO Yu*, ZHANG Hui, WANG Siming, LI Xiaohua(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Study differences in water-soluble protein content from 15 origins in Changbai Mountain area to identify the quality of ginseng from different origins. **METHODS** The electrophoresis spectras about ginseng water-soluble protein was got with SDS-PAGE. The electrophoresis spectras were transened through the gel imaging software into concentration Rf spectras. The spectra of ginseng protein from different origins was superimposed and concentration of spectras were compared. **RESULTS** The amount of main absorption peak was 13, and the number of absorption peaks were similar, but the fingerprint informations about the contents were different with the different origins. **CONCLUSION** The contents of water-soluble protein in ginseng are different from different origins.

KEY WORDS: ginseng; different regions; water-soluble protein; SDS-PAGE

人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer.)为五加科多年生草本植物^[1], 在我国古代的复方和单味药的应用中都具有重要的地位, 随着现代技术的发展, 人参的深度开发和应用已成为一种必然趋势。然而, 随着人们种植人参数量的增加, 不同产地的人参质量却参差不齐。作为人参的重要产区东北三省所产出的人参也不同程度的出现这种现象, 这将严重影响和限制人参产业的发展。因此亟需一种简单、快速、有效的方法来鉴别不同产区人参的产品质量, 为人参产品的深加工和科学研究把好质量关。

1 实验材料

1.1 药材

实验用 5 年生人参分别于 2011 年采自吉林省

的集安县、抚松北岗镇、长白新房子镇、安图白河镇、敦化青沟子乡、通化县、临江东北岔乡、安图万宝镇、抚松板石河村、琿春市、抚松黄泥村、敦化秋梨沟镇、长白二道岗村, 以及黑龙江的穆棱市和牡丹江市, 共采集样品 15 批次, 经长春中医药大学药教研室姜大成教授鉴定均为五加科植物人参 *Panax ginseng* C.A.Mey.的根。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 Quixstand 中空纤维过滤系统、EPS301 电泳仪及 SE260 垂直板电泳槽(美国 GE 公司); Dolphin-1D 凝胶图像分析系统(美国 WEALTEC 公司); DS-1 高速组织捣碎机(上海标本模型厂); AL204 电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司); GS-6R 台式大容量冷冻离心机(德国

基金项目: 国家科技重大专项(2011ZX09401-305-02); 国家科技支撑计划(2012BAI29B05); 吉林省医药产业发展专项(YYZX201134)

作者简介: 白雪媛, 女, 硕士, 助理研究员 Tel: (0431)81660061 E-mail: baixy1212@163.com *通信作者: 赵雨, 男, 博士, 研究员 Tel: (0431)86172300 E-mail: cnzhaoyu@yahoo.com.cn

BECKMAN 公司); Minispin 高速离心机(德国 Eppendorf 公司); LL3000 冷冻干燥机(德国 Heto 公司)。

1.2.2 试剂 三羟甲基氨基甲烷(tris), 丙烯酰胺(acrylamide), 甲叉双丙烯酰胺(N, N'-methylene bisacrylamide), 甘氨酸(glycine), 过硫酸铵(ammonium persulfate), 溴酚蓝(bromophenol blue)均购自 Amresaco 公司; 十二烷基硫酸钠(SDS), 甘油(glycerol), 四甲基乙二胺(TEMED), β -巯基乙醇(β -mercaptoethanol), 考马斯亮蓝 R₂₅₀(coomassie brilliant blue R₂₅₀)均购自 Sigma 公司; 低分子量标准蛋白质(包括 6 种标准蛋白, 分子量分别为 97 400, 66 200, 43 000, 31 000, 20 100, 14 400 Da)均购自中国科学院上海生物化学研究所; 其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 样品制备

将采集的人参洗净, 用滤纸吸干其表面水分, 称重(每批样品至少取 3 根人参), 匀浆, 按料液比 1 : 10 加入 10 mmol·L⁻¹ pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液 4 °C 浸提 20 h, 浸提液 4 000 r·min⁻¹ 低温离心 30 min, 收集上清液, 用膜孔径为 0.45 μ m 的中空纤维膜过滤系统进行微滤, 过滤液用膜孔径为 10 kDa 的中空纤维膜过滤系统进行超滤、浓缩, 将内滤液冷冻干燥, 获得人参水溶性蛋白冻干品贮于 -20 °C 冰

表 1 各产地人参总蛋白含量

Tab 1 The total protein contents in ginseng from all origins

产地	集安	北岗	新房子	白河	青沟子	通化县	东北岔	万宝	板石河	珲春	黄泥	秋梨沟	二道岗	穆棱	牡丹江
总蛋白含量/ μ g·mg ⁻¹	0.343	0.423	0.518	0.561	0.709	0.524	0.487	0.517	0.516	0.605	0.504	0.501	0.341	0.293	0.542

高产区分别是青沟子和珲春, 中产区为白河、牡丹江、通化县、新房子、万宝、板石河、黄泥、秋梨沟、东北岔和北岗, 低产区是集安、二道岗和穆棱 3 个产地。该结果只是针对人参中的总蛋白含量所做出的初步判断, 并不能全面体现出真实的客观信息。

3.2 不同产地人参中水溶性蛋白含量的凝胶成像分析

不同产地人参水溶性蛋白电泳见图 1。通过 Dolphin-1D 凝胶成像分析系统对电泳图进行分析, 得到指纹图谱后再经 Origin 7.5 软件生成各泳道的指纹图谱叠加图见图 2。

箱备用。15 批样品均采用此制备工艺。

2.2 蛋白含量测定

应用 Bradford 蛋白质定量试剂盒对 15 批样品中的水溶性蛋白进行含量测定, 测定方法见试剂盒使用说明书。

2.3 电泳

本实验采用垂直板 SDS-PAGE 法, 分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 5%, 电极缓冲液为 Tris-甘氨酸, 15 批样品均按同样鲜重称取水溶性蛋白冻干品后等体积溶解, 以溴酚蓝作指示剂, 每孔加样 20 μ L, 每板恒流 15 mA 进行电泳。电泳结束后用考马斯亮蓝 R₂₅₀ 染色, 然后以甲醇-冰醋酸-蒸馏水(4.5 : 4.5 : 1)为脱色液脱色, 至胶片背景清晰。

2.4 数据分析

采用 Origin 7.5 软件对数据图谱进行叠加分析。

3 结果

3.1 不同产地人参中水溶性蛋白含量的常规计算

根据 Bradford 蛋白质定量试剂盒测定 15 个产地中鲜品人参水溶性蛋白的总含量, 结果见表 1。根据浓度值可大致分为 3 个区段: 一区段为浓度值在 0.6~0.7 μ g·mL⁻¹ 之间, 包含 2 个产地; 二区段为浓度值在 0.4~0.5 μ g·mL⁻¹ 之间, 包含 10 个产地; 三区段为浓度值在 0.2~0.3 μ g·mL⁻¹ 之间, 包含 3 个产地。由此可见, 一区段占 13%(高产地区), 二区段占 67%(中产地区), 三区段占 20%(低产地区)。

由电泳结果可知, 不同产地人参中水溶性蛋白谱带条数无明显差别, 均显示 13 条谱带, 但在含量上差异较大, 水溶性蛋白相对分子量主要分布在 86 000~93 000 Da 之间。

由结果可知, 指纹图谱主要显示出 13 个蛋白带峰, 根据相对迁移率(Rf)可将其分为 4 个区段, I 区: Rf 值在 0~0.30 之间, 仅见 1 号、2 号蛋白带峰, 且为弱峰; II 区: Rf 值在 0.30~0.55 之间, 可见 3 号、4 号和 5 号 3 个蛋白带峰, 其中 3 号和 4 号为强峰且以肩峰形式存在, 5 号为弱峰; III 区: Rf 值在 0.55~0.80 之间, 可见 6 号、7 号带的强峰和 8 号、9 号、10 号、11 号带的弱峰, 且 8 号、9 号带

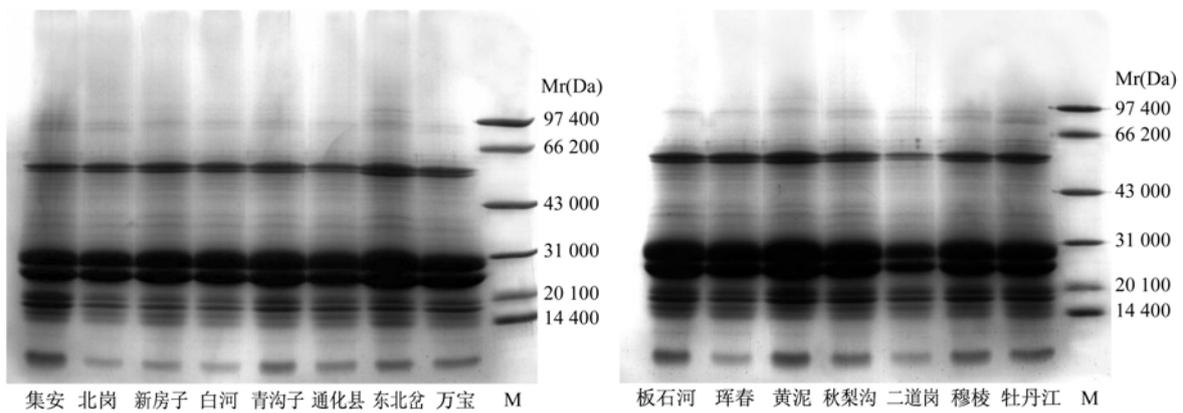


图 1 不同产地人参水溶性蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fig 1 The electrophoresis of SDS-PAGE of water-soluble protein in ginseng from different origins

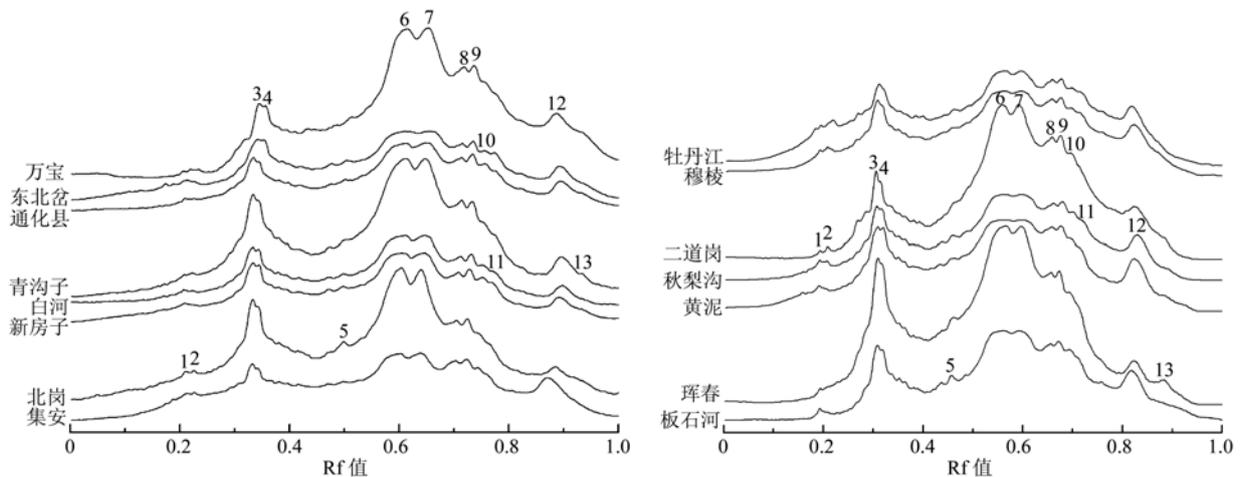


图 2 不同产地人参水溶性蛋白指纹图谱叠加图

Fig 2 The fingerprint overlay of water-soluble protein with ginseng from different origins

的峰高总是比 6 号、7 号低；IV 区：Rf 值在 0.80~1.00 之间，可见 12 号蛋白带的强峰和个别产地的 13 号蛋白条带。

不同产地人参水溶性蛋白含量差异较大，但从条带浓度指纹图谱的峰形上大致可以划分为 2 类：第 1 类为抚松北岗、敦化青沟子乡、安图万宝镇、珲春市和长白二道岗村，这 5 个产地的人参水溶性蛋白含量相对较高，尤其以蛋白条带 3, 4, 6, 7 和 12 的含量居高；第 2 类为集安县、长白新房子镇、安图白河镇、通化县、临江东北岔乡、抚松黄泥村、敦化秋梨沟镇、黑龙江穆棱和牡丹江，这 9 个产地的人参水溶性蛋白含量相对较低；剩下的抚松板石河村所产的人参其蛋白含量相对居中程度。对于蛋白条带 5 而言，抚松北岗、板石河、珲春以及敦化秋梨沟所产的人参中此种蛋白含量相对较高。对于蛋白条带 13，珲春产人参含量相对最高，其次为敦化青沟子乡，

其他 13 个产区人参中未见此种蛋白。

4 讨论

SDS-PAGE 作为一种经典技术，因其方法简单、分辨率较高、重复性较好，在蛋白质研究中被广泛应用^[2-6]。本实验采用 SDS-PAGE 法对不同产地的 15 批人参药材进行了研究，并通过凝胶成像分析系统和 Origin 7.5 软件，将电泳胶片生成更直观的浓度-比移值图谱形式，导出重要的技术参数，提供了更可靠的分析依据来衡量人参中水溶性蛋白的含量变化情况，可代替对样品进行蛋白含量测定的繁琐实验，具有耗时短、速度快、无物质干扰、结果准确等优点。

本研究结果与常规方法的计算结果基本一致，并且能概括出常规方法中所无法体现的其他重要信息。不同产地人参中含有 13 种水溶性蛋白，但各产地间 13 种蛋白的含量却相对不同，呈现出不规则变化趋势，这可能与不同产地的局部生长

环境、坡向、海拔高度、经纬度、日照时间、雨水、病虫害以及农药、杀虫剂的使用等因素密切相关。例如对于抚松北岗、敦化青沟子乡、安图万宝镇、珲春市和长白二道岗村而言,这5个产地的人参水溶性蛋白含量相对较高,尤其以蛋白条带3,4,6,7和12的含量居高。从地理位置上可以看出,除了抚松北岗和长白二道岗以外,敦化青沟子、安图万宝和珲春这3个产地基本位于吉林省的东北部地区,这说明对于人参蛋白带3,4,6,7和12而言,这3个位于东北部地区所产的人参具有较高的含量,可以为日后专项研究此5种人参蛋白提供理论依据。而通过观察集安县、长白新房子镇、安图白河镇、通化县、临江东北岔乡、抚松黄泥村、敦化秋梨沟镇、黑龙江穆棱和牡丹江这9个人参水溶性蛋白含量相对较低的产区可以发现,除了黑龙江省的牡丹江和穆棱位于吉林省东北部以外,集安、长白新房子、安图白河、通化县、临江东北岔和抚松黄泥村这6个产区均基本上位于吉林省的东南部地区,所产人参中水溶性蛋白含量相对较低。对于抚松县的3个产地北岗、板石河和黄泥村而言,人参蛋白含量呈高、中、低的变化趋势,这可能与抚松县的特殊地理位置有关,通过分析发现,位于抚松县的东北部地区所产的人参中蛋白含量相对较高,而位于其西南及东南地区所产的人参中蛋白含量

相对较低,因此可粗略地认为抚松县为一分界线,大体上可以把吉林省东部地区所产的人参质量做一划分,为吉林省的人参种植、栽培和繁育提供地理位置依据。

人参的蛋白种类和含量是基因表达的结果,蛋白含量的高低可间接反应各产地间的地域性差别,因此本研究对进一步推动人参产业的发展和人参系列产品质量的提高等都较为重要。

REFERENCES

- [1] YAO Z S, WANG D Q, XIONG Y K. Pharmaceutical Botany(药用植物学) [M]. Beijing: Traditional Chinese Medicine Press, 2005: 310.
- [2] ZHANG W, JIANG X G, MA J, et al. Study on the thermal stability of ginseng protein by SDS-PAGE and gel filtration chromatography [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2007, 9(4): 7-10.
- [3] ZHANG W, LI H Y, MA J, et al. Purification of several ginseng proteins [J]. J Jilin Agricultural Univ(吉林农业大学学报), 2008, 30(1): 36-39.
- [4] HAO C, HAN L P, JIANG L L, et al. Purification and characterization of low molecular weight polypeptides from the venom of Guangdong cobra(Naja Naja Atra) [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2011, 28(5): 383-386.
- [5] JIANG X G, ZHAO Y, ZHANG W, et al. Studies on SDS-PAGE fingerprints chromatogram of ginseng hydrophilic proteins [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2008, 28(6): 873-876.
- [6] NIU F, ZHAO Y, TANG R N, et al. Study on SDS-PAGE fingerprints chromatogram of Sika Antlerbase proteins [J]. China Pharm(中国药业), 2010, 19(10): 21-22.

收稿日期: 2012-03-13

超临界 CO₂ 萃取远志挥发油气相指纹图谱对比研究

王颖莉, 王秀文, 裴晓丽, 赵晓光, 陆芳芳, 刘亚明^{*}(山西中医学院中药系, 太原 030024)

摘要: 目的 建立远志挥发油成分的气相指纹图谱, 研究种植与野生、不同提取方法对远志挥发油成分的影响。方法 采用超临界 CO₂ 萃取对 10 批不同产地的远志提取挥发油, 用气相色谱仪对挥发油进行分析, 建立超临界 CO₂ 远志挥发油的气相指纹图谱。结果 超临界 CO₂ 萃取远志挥发油出油率在 0.29%~0.82% 之间, 高于水蒸气蒸馏法提取率, 与水蒸气蒸馏法提取法得到的易挥发油成分基本相同, 人工种植较野生远志挥发油成分种类更丰富。结论 超临界 CO₂ 萃取法提取远志挥发油效率高, 为研究远志挥发性成分提供了较好的提取方法。

关键词: 远志; 挥发油; 超临界 CO₂; 气相色谱指纹图谱

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)11-0983-05

基金项目: 山西省科技攻关项目(20100311090); 山西省科技厅平台建设项目(2011091014); 山西省卫生厅科技攻关项目(2008034)

作者简介: 王颖莉, 女, 博士生, 副教授 Tel: (0351)2272269 E-mail: wyltyut@163.com ^{*}通信作者: 刘亚明, 男, 博士, 教授, 博导 Tel: (0351)2272163 E-mail: liuyaming66@yahoo.com.cn