

· 中药工业 ·

硫磺菌多糖的分离纯化及体外抗氧化、抗肿瘤活性初探[△]

胡亚平¹, 王锦¹, 郑丽¹, 田新利¹, 代玲¹, 林玲辉¹, 王立安^{2*}

(1. 邢台医学高等专科学校, 河北 邢台 054000; 2. 河北师范大学生命科学院, 河北 石家庄 050024)

[摘要] 目的: 将硫磺菌子实体粗多糖进行分离纯化, 对纯化产物进行理化特性和抗氧化抗肿瘤活性的检测。方法: 硫磺菌子实体干粉采用水提醇沉、Sevage 法去蛋白制备得粗多糖, 采用 DEAE-52 色谱柱分离纯化粗多糖, 通过扫描电镜(SEM)、红外光谱(IR)和氢核磁共振谱(¹H-NMR)对纯化后的多糖进行检测, 采用清除 DPPH 自由基和 MTT 法检测多糖活性。结果: 硫磺菌子实体分离得到三种多糖组分(LSPS-I、LSPS-II、LSPS-III)。LSPS-I 和 LSPS-II 多糖的含量分别为 85.43% 和 80.12%; LSPS-I 呈现片状结构, LSPS-II 呈现不规则多面体结构; LSPS-I 和 LSPS-II 均具有糖类物质的吸收峰且为 α 构型; LSPS-I 和 LSPS-II 均表现出较强的清除 DPPH 自由基活性, EC₅₀ 值分别为 10.74、15.67 mg·mL⁻¹。LSPS-II 对人胃癌细胞株 BGC 的增殖有较强的抑制作用, IC₅₀ 值为 848 μg·mL⁻¹。结论: 硫磺菌子实体粗多糖的分离纯化产物 LSPS-I 和 LSPS-II 均有较强的抗氧化活性, LSPS-II 还有一定的抗胃癌细胞作用。

[关键词] 硫磺菌多糖; DPPH 自由基; 抗氧化; 人胃癌细胞株 BGC; 抗肿瘤

Isolation, Purification, Antioxidant and Antitumor Activities of Polysaccharides from *Laetiporus sulphureus*

HU Ya-ping¹, WANG Jin¹, ZHENG Li¹, TIAN Xin-li¹, DAI Ling¹, LIN Ling-hui¹, WANG Li-an^{2*}

(1. Xingtai Medical College, Xingtai 054000, China;

2. College of life sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China)

[Abstract] **Objective:** To isolate and purify the total polysaccharides extracted from *Laetiporus sulphureus* fruit body. The physicochemical properties and antioxidant and antitumor activities of the purified products were detected. **Methods:** Using *L. sulphureus* fruit body as material, the crude polysaccharide was extracted by using water extraction and alcohol precipitation preparation, protein was removed by Sevage method, the purified polysaccharide was obtained through the DEAE-52 column. The purified polysaccharide was detected by scanning electron microscopy(SEM), infrared spectroscopy(IR) and hydrogen nuclear magnetic resonance(¹H-NMR). The activity of polysaccharides was detected by scavenging DPPH radical and MTT. **Results:** Three components(LSPS-I, LSPS-II and LSPS-III) were obtained from *L. sulphureus* fruit body. The content of polysaccharide from LSPS-I and LSPS-II were 85.43% and 80.12%, respectively. LSPS-I showed a lamellar structure, LSPS-II showed irregular polyhedron structure. LSPS-I and LSPS-II had carbohydrate absorption peak and alpha configuration. LSPS-I and LSPS-II had strong activity of scavenging DPPH free radicals, and EC₅₀ values were 10.74 and 15.67 mg·mL⁻¹, respectively. Antitumor results showed that LSPS-II had a strong inhibitory effect on the proliferation of human gastric cancer cell line BGC, and the IC₅₀ value was 848 μg·mL⁻¹. **Conclusion:** LSPS-I and LSPS-II had strong antioxidant activity. LSPS-II also had certain anti gastric cancer effect.

[Keywords] *Laetiporus sulphureus* polysaccharide; 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH); antioxidant; human gastric cancer cell line BGC; antitumor

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180130001

[△] [基金项目] 河北省科技计划重点项目(16237301D); 河北省现代农业产业技术体系创新团队项目(HBCT2018050207); 河北省高等学校科学技术研究项目(ZC2016059); 邢台市科技计划项目(2015ZC167); 河北师范大学科技类技术创新基金(L2017K03)

* [通信作者] 王立安, 教授, 研究方向: 天然产物研究与开发; Tel: 13780207698, E-mail: wlian1965@126.com

硫磺菌(*Laetiporus sulphureus*)又名黄芝、硫磺多孔菌、硫磺多孔菌,独立或者呈簇生长于腐烂的落叶或针叶树种的原木、树桩和树干上,是一种有重要利用价值的食用兼药用真菌,广泛分布于欧洲、亚洲和北美洲的美国^[1]。张津等优化了从硫磺菌子实体中提取水溶性多糖的提取工艺^[2];Lung M Y.从硫磺菌菌丝体和发酵液中分别提取胞内多糖和胞外多糖,发现它们均具有一定的抗氧化活性^[3];闫梅霞等发现硫磺菌菌丝体粗多糖对小鼠 Lewis 肺癌具有一定的体内抑制作用,最大抑制作用达到了35.7%^[4];王娟等发现硫磺菌摇瓶发酵液的乙酸乙酯提取物对8种植物病原菌、1种霉菌、7种细菌都有较为显著的抗菌作用^[5]。目前对于硫磺菌多糖的研究相对较少,特别是关于硫磺菌多糖的纯化和结构的研究还鲜见报道。

本实验室前期已完成了硫磺菌野生菌种的驯化。本实验以实验室培育的硫磺菌子实体为材料提取粗多糖,进行分离纯化,并对纯化后的多糖进行了理化特性的研究,以及体外抗氧化活性和抗肿瘤活性的初步探究,以期对硫磺菌多糖的进一步研究和开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

硫磺菌子实体,由河北师范大学真菌生化与分子生物学实验室种植;人胃癌 BGC823 细胞株,保存于河北师范大学真菌生化与分子生物学实验室,液氮冻存,按常规方法传代培养。

1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2, 6-二叔丁基对甲酚(BHT)、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、顺铂(DDP),北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清、RPMI1640 培养基,浙江天杭生物科技有限公司;实验室用水均为超纯水,其余所用试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

VERTEX 70 傅立叶变换红外-拉曼-红外显微镜联用光谱仪,德国布鲁克;S-4800 冷场发射扫描电子显微镜,日本日立;BioLogicLP 色谱系统, Bio-RAD 公司;MULTISKAN GO 酶标仪, Thermo 美国。

1.3 硫磺菌多糖的制备及分离纯化

1.3.1 粗多糖的制备 新鲜硫磺菌子实体,烘干机干

燥,粉碎后得到硫磺菌子实体干粉,称重得质量 m_1 ,向其中加蒸馏水加热浸提三次(液料比 $20\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, 4 h),真空抽滤,合并滤液,旋转蒸发仪 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 浓缩,将得到的浓缩液采用 Sevage 法除蛋白^[6],弃掉有机相和蛋白层,得到水相层,重复脱蛋白操作直至无蛋白层析出。向收集的水相层加入4倍体积无水乙醇,于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置醇沉过夜, $4\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min ,真空冷冻干燥,得到硫磺菌粗多糖(LSPS),称重得质量 m_2 。按公式(1)计算 LSPS 得率。

$$\text{LSPS 得率}(\%) = m_2/m_1 \times 100\% \quad (1)$$

1.3.2 DEAE-52 柱色谱 取硫磺菌粗多糖 150 mg 溶于 10 mL 蒸馏水中,配成 $15\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的多糖水溶液,进行 DEAE-52 离子交换柱色谱,所用色谱柱规格为 $1.5\text{ cm} \times 23\text{ cm}$ 。以 0 、 0.1 、 0.3 、 0.5 、 $0.7\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液进行梯度洗脱,控制流速为 $2.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,以 $4\text{ mL}/\text{管}$ 收集洗脱液,使用苯酚-硫酸法进行多糖显色,并在 490 nm 下测量其吸光度,直到无多糖组分流,共收集 60 管 。以洗脱管数为横坐标,吸光度为纵坐标绘制洗脱曲线图,合并洗脱峰部分, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 浓缩, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空冷冻干燥后置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.4 扫描电镜观察

取适量冻干的多糖样品粉末,通过双面胶粘在样品台上,清除多余的不能被粘附在样品台上的粉末,使得样品台上只保留一层薄薄的待测样品。喷镀金原子,用扫描电子显微镜观察样品表面并拍照。

1.5 葡萄糖标准曲线的绘制及多糖含量的测定

1.5.1 葡萄糖标准曲线的绘制 采用苯酚硫酸法,参考文献方法^[7]稍做改动。用蒸馏水配制 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的葡萄糖标准液。取 10 只 100 mL 容量瓶,分别加入 0 、 0.2 、 0.4 、 0.6 、 0.8 、 1.0 、 1.2 、 1.4 mL 葡萄糖标准液,定容至刻度。各取 2 mL 样品放入试管内,分别加入 5% 苯酚溶液 1 mL ,浓硫酸 5 mL ,混匀。冷却至室温后,用酶标仪于 490 nm 处测吸光度值,以吸光度值(Y)为纵坐标,葡萄糖含量($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, X)为横坐标,绘制葡萄糖标准曲线。得到标准曲线方程式为 $Y = aX + b$ 。

1.5.2 多糖含量的测定 用蒸馏水配制一定浓度的多糖溶液,浓度为 $w(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$,取 1 mL 的多糖溶液用上述的硫酸苯酚法检测,得到吸光度值 A_1 。按

公式(2)计算多糖含量。

$$\text{多糖含量}(\%) = (A_1 - a) / wb \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_1 为用苯酚硫酸法测定的吸光度值; a 、 b 为葡萄糖标准曲线公式中的系数值; w 为多糖溶液浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

1.6 红外光谱扫描

取 2 mg 左右干燥的多糖样品, 与 300 mg 左右 KBr 粉末, 红外灯下在玛瑙研钵中轻轻研匀压片, 进行红外光谱扫描, 扫描范围 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 。

1.7 氢谱分析

取多糖 10 mg 左右, 溶于 0.5 mL 重水(D_2O)中, 用 600 MHz 核磁共振仪测定。

1.8 体外抗氧化、抗肿瘤活性测定

1.8.1 抗氧化活性 采用 DPPH 自由基(DPPH·)清除能力的测定法, 参考文献方法^[8]稍做改动。用无水乙醇配制 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH·工作液, 将待测多糖配成不同浓度的样品液, 以同一浓度 BHT 为阳性对照, 依次向 96 孔板中加入 100 μL 不同浓度的样品液, 100 μL 的 DPPH 工作液, 室温下暗反应震荡 30 min, 酶标仪测定 517 nm 处的吸光度值 A 。按公式(3)计算 DPPH·清除率。

$$\text{清除率}(\%) = [A_0 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100\% \quad (3)$$

式中: A_i 为 100 μL DPPH·工作液 + 100 μL 样品液的 OD_{517} ; A_j 为 100 μL 无水乙醇 + 100 μL 样品液的 OD_{517} ; A_0 为 100 μL DPPH·工作液 + 100 μL 蒸馏水的 OD_{517} 。

1.8.2 抗肿瘤活性 采用 MTT 法, 参考文献方法^[9]稍做改动。用 RPMI 1640 将待测多糖配成不同浓度的多糖样品液, 以同一浓度顺铂为阳性对照。取对数生长期的 BGC 胃癌细胞, 以 1×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 细胞浓度接种于 96 孔培养板中, 每孔加入 100 μL , 于二氧化碳培养箱(5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$)培养 24 h 后, 加入 100 μL 多糖样品液, 阴性对照组中加 100 μL 的无血清培养基, 并设空白孔。培养 48 h 后, 离心弃去上清, 每孔加 100 μL MTT ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 继续培养 4 h 后, 离心($2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min)弃上清, 每孔加二甲基亚砜 150 μL , 震荡 10 min, 用酶标仪检测 570 nm 的吸光度值 A 。按公式(4)计算癌细胞增殖抑制率。

$$\text{癌细胞增殖抑制率}(\%) = (1 - A_s / A_0) \times 100\% \quad (4)$$

式中: A_s 为实验组吸光度值; A_0 为空白对照组吸光度值。

1.9 数据处理

本实验进行三次平行实验, 测定结果以平均值 $\pm$ 标准差(SD)表示, 数据分析采用 originpro 7.5、MestReNova 软件和 IC_{50} 软件。

2 结果与分析

2.1 多糖的制备及分离纯化

从 40 g 硫磺菌子实体干粉中得到的硫磺菌粗多糖(LSPS)为 2.82 g, 计算得粗多糖得率为 7.05%。

采用 DEAE-52 离子交换柱对 LSPS 150 mg 进行分离纯化, 梯度洗脱曲线如图 1 所示。用水和不同浓度的 NaCl 溶液洗脱, 共得到三个洗脱峰, 合并各洗脱峰组分, 分别对其减压浓缩, 冷冻干燥后共收集得到 3 个纯化后的多糖组分, 分别命名为 LSPS-I、LSPS-II 和 LSPS-III, 其中 LSPS-I 为水洗脱得到, 共获得 36 mg; LSPS-II 和 LSPS-III 分别为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 和 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 洗脱得到, 分别获得 24 mg 和 4 mg。计算得 LSPS-I、LSPS-II 和 LSPS-III 的得率分别为 24%、16% 和 2.7%。因为 LSPS-III 含量太少后续未对其做进一步研究, 仅对 LSPS-I 和 LSPS-II 进行了研究。

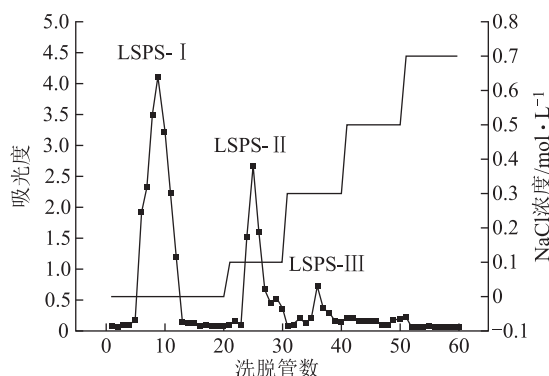


图1 硫磺菌粗多糖经 DEAE-52 离子交换柱的梯度洗脱曲线

2.2 物理性状和扫描电镜观察

图 2 是 LSPS-I 和 LSPS-II 的电子显微镜扫描结果, 给出了多糖样品的表面结构特征。

冷冻干燥后的多糖组分 LSPS-I 呈现白色透明冰晶状, 1 万倍放大后在扫描电镜下形态如图 2 A 所示, 呈透明玻璃状, 其表面光滑, 并伴有一些小的凹槽; 冻干后的 LSPS-II 呈现白色粉末状, 1 万倍放大后在扫

描电镜下形态如图2B所示,呈不规则的砖块状。可见 LSPS-I和 LSPS-II为两种不同的多糖。

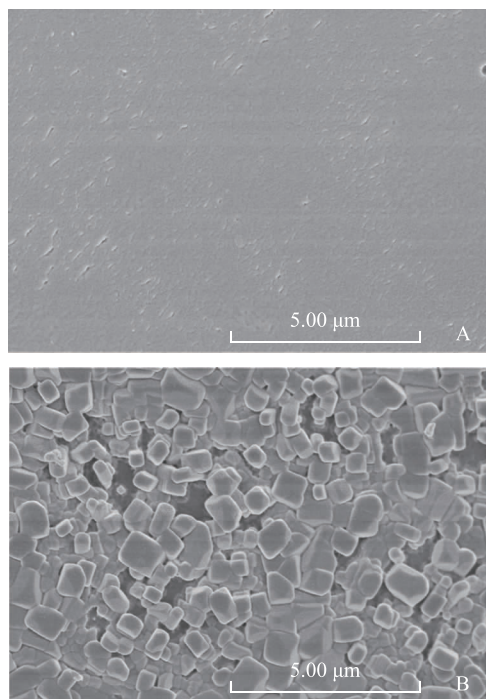


图2 LSPS-I和LSPS-II的扫描电镜图

2.3 葡萄糖标准曲线及多糖含量

以葡萄糖溶液的浓度为横坐标,490 nm吸光值为纵坐标,绘制标准曲线,数据处理后得标准曲线回归方程: $Y = 0.008X - 0.030$, $r = 0.997$ 。实验表明葡萄糖浓度在 $0 \sim 120 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内,吸光度与葡萄糖浓度呈良好的线性关系。通过葡萄糖标准曲线方程,计算得到,硫磺菌粗多糖(LSPS)的多糖含量为 $(39.13 \pm 1.02)\%$ 。经过 DEAE-52 色谱柱得到纯化的硫磺菌多糖 LSPS-I 和 LSPS-II,分别为 $(85.43 \pm 1.23)\%$ 和 $(80.12 \pm 1.19)\%$ 。此结果表明,经过 DEAE-52 纤维素色谱柱的纯化,硫磺菌多糖的纯度有了明显的提高。

2.4 IR 分析

LSPS-I 和 LSPS-II 的红外光谱仪扫描结果见图3。由图3可知,LSPS-I 在 3421 cm^{-1} 处有一明显吸收峰,此为多糖特征性 O-H 的伸缩振动峰,是由糖分子内或分子间氢键 O-H 伸缩振动而引起的吸收,形宽且钝,说明羟基不是游离的,而是在分子间发生了缔合^[10]; 2927 cm^{-1} 附近的吸收峰为次甲基($-\text{CH}_2$)中 C-H 的伸缩振动的吸收峰; 1652 cm^{-1} 附近的吸收峰为 C=O 伸缩振动峰^[11]; 1419 cm^{-1} 附

近的吸收峰可能是由 $-\text{COOH}$ 中的 C-O 键伸缩振动或是 C-H 键的反对称伸缩振动和变角振动引起的^[12]; 1020 cm^{-1} 附近的吸收峰是由 C-O-H 和吡喃糖环的 C-O-C 中的两种 C-O 键的伸缩振动引起的^[13]。

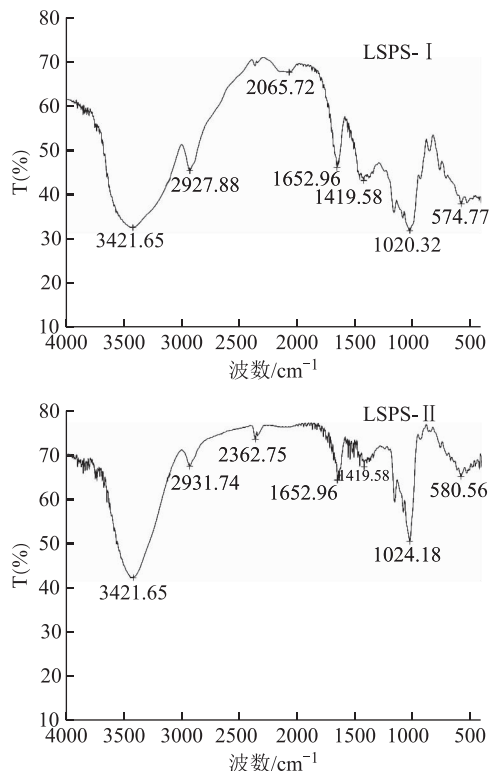


图3 LSPS-I和LSPS-II的红外光谱图

LSPS-II 在 3421 cm^{-1} 处有吸收,这是 O-H 伸缩振动,与 LSPS-I 相似,说明羟基在分子间缔合; 2931 cm^{-1} 附近的吸收峰为 C-H 伸缩振动; 1652 cm^{-1} 附近的吸收峰为 C=O 伸缩振动峰; 1419 cm^{-1} 附近有与 LSPS-I 相似的吸收峰; 1024 cm^{-1} 附近有与 LSPS-I 相似的吸收峰。

综上所述,由红外图谱可知 LSPS-I 和 LSPS-II 均具有明显的糖类化合物的特征。

2.5 $^1\text{H-NMR}$ 分析

LSPS-I和 LSPS-II的 $^1\text{H-NMR}$ 分析见图4。 $^1\text{H-NMR}$ 主要解决多糖结构中糖苷键构型及结构中氢个数比的问题,但是由于非异头质子化学位移 δ 相近,且有部分重叠现象,使多数质子信号较难解析,一般 β 型异头质子区域化学位移位于 $\delta 4.4 \sim 5.0$, α 型异头质子区域化学位移位于 $\delta 5.0 \sim 5.5$ ^[14]。LSPS-I 的 $^1\text{H-NMR}$ 信号中有 $\delta 5.35$ 、 5.17 和 5.14 , LSPS-II 的 $^1\text{H-NMR}$ 信号有 $\delta 5.39$, LSPS-I 和 LSPS-II 的 $^1\text{H-NMR}$ 信号均集中在 $\delta 5.0 \sim 5.5$ 可见这两种多糖均存在 α -糖苷构型异头氢。

图 4 中化学位移在 δ 3.4 ~ 4.2 之间的信号主要是糖残基上 C_2-H 到 C_6-H 的信号位移峰^[15]。综上分析结果表明, LSPS-I 和 LSPS-II 均为主要以 α 构型链接的多糖。

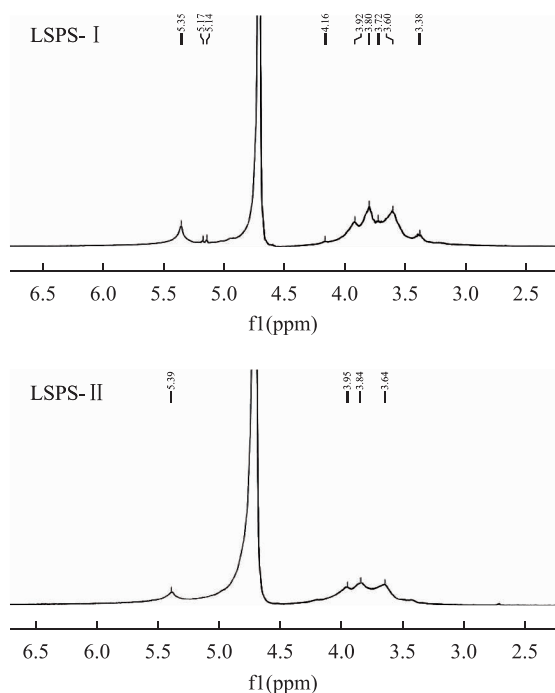


图 4 LSPS-I 和 LSPS-II 的核磁共振氢谱图

2.6 对 DPPH·的清除活性

由图 5 可知, LSPS-I 和 LSPS-II 与标准抗氧化剂 BHT 比较, 对 DPPH·均有一定的清除活性, 两种多糖在设定浓度范围内, 随着样品浓度增大, 清除率相应提高, 当样品浓度为 $6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, LSPS-I 和 LSPS-II 的 DPPH·清除率分别为 $(40.64 \pm 0.37)\%$ 和 $(35.49 \pm 2.79)\%$, 但阳性对照 BHT 在浓度 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, DPPH·清除率已经达到 79.82% 。计算得, LSPS-I 和 LSPS-II 对 DPPH·清除率的 EC_{50} 值分别为 10.74 和 $15.67 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, LSPS-I 对 DPPH·的清除活性优于 LSPS-II。

2.7 MTT

通过检测发现 LSPS-I 对 BGC 细胞增殖无抑制效果, LSPS-II 对 BGC 细胞增殖的抑制效果见图 6, 与标准抗肿瘤药物顺铂 DDP 比较, 对 BGC 细胞有一定的抑制作用, 在设定浓度范围内, 随着样品浓度增大, 抑制率相应提高, 当 LSPS-II 在浓度 $1000 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对 BGC 的抑制率达到了 $(55.64 \pm 1.37)\%$, 其 IC_{50} 值为 $848 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 表现出很强的体外抗肿瘤活性。

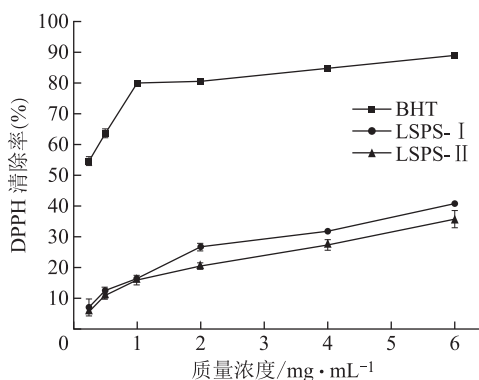


图 5 LSPS-I 和 LSPS-II 对 DPPH·的清除作用

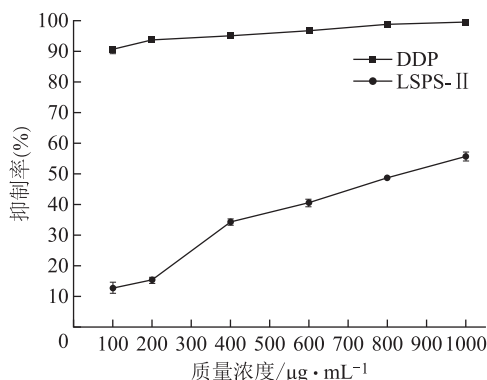


图 6 LSPS-II 对 BGC 细胞的抑制作用

3 讨论和结论

硫磺菌作为一种珍贵的食药两用真菌, 本实验室已完成对其的野生驯化并高产栽培。本研究首次从自行栽培的硫磺菌中得到了两个多糖组分 LSPS-I 和 LSPS-II。由于在多糖纯化中色素和蛋白质等杂质会对其的分离造成干扰, 所以在分离前期一般进行除色素和蛋白的操作。本实验提取得到的硫磺菌粗多糖本身颜色为白色无色素干扰, 所以后期只进行了 Sevage 法除蛋白的操作。

由于多糖的分子结构等与其生物学活性具有密切的关系, 弄清多糖的结构可以更深入的揭示其在生命过程中的作用^[16]。多糖结构的检测手段有很多, 本实验主要采用 SEM 观察了 LSPS-I 和 LSPS-II 的物理结构, 采用苯酚硫酸法检测了它们的多糖纯度, 对于多糖纯度的检测, 由于目前尚未找到比较合适的标准品, 因此通过各种方法得到的多糖纯度仍是比较粗略的结果^[17]。采用 IR 和 $^1\text{H-NMR}$ 分析了它们的糖键结构, 表明 LSPS-I 和 LSPS-II 均具有糖类物质的吸收峰且为 α 构型。

本实验采用清除 DPPH·实验评价 LSPS-I 和 LSPS-II 的体外抗氧化活性, 结果显示这两种多糖均

具有较好的体外自由基清除能力,且均呈现良好的剂量效应关系。本实验还探讨了 LSPS-I 和 LSPS-II 对 BGC 细胞的抑制作用, LSPS-II 对 BGC 细胞增殖的具有较好的抑制效果。综上所述,分离自硫磺菌子实体的多糖组分 LSPS-I 和 LSPS-II 可作为抗氧化剂和抗肿瘤制品进一步研究,并应用于食品医药领域。

参考文献

- [1] 卢东升,贾晓,罗春芳. 硫磺菌生物学特性研究[J]. 中国食用菌,2009,28(5):10-11.
- [2] 张津,郁建平. 鸡冠菇水溶性多糖提取工艺的优化[J]. 食品工业科技,2009(5):211-212.
- [3] Lung M Y, Huang W Z. Antioxidant properties of polysaccharides from *Laetiporus sulphureus* in submerged cultures[J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 11 (23): 6350-6358.
- [4] 闫梅霞,关一鸣,胡清秀,等. 硫磺菌菌丝体粗多糖对小鼠 Lewis 肺癌的体内抑制[J]. 食用菌学报,2011,18(1):46-48.
- [5] 王娟,高锦明,张鞍灵,等. 硫磺菌发酵液抗菌活性的初步研究[J]. 西北农业学报,2006,15(6):204-207.
- [6] 扈瑞平,张兴夫,杜玲,等. 沙葱多糖 Seville 法除蛋白工艺的研究[J]. 内蒙古大学学报(自然版),2009,40(6):658-662.
- [7] 钟建平,钟春燕. 苯酚-硫酸比色法测定保健食品多糖的研究[J]. 中国卫生检验杂志,2001,11(6):675-675.
- [8] Omp S, Tejk B. DPPH antioxidant assay revisited. Food Chem,2009,113(4):1202-1205.
- [9] 卢燕,卢华杰,刘焱文,等. 茯苓酸性多糖分级提取及其抗肿瘤活性比较[J]. 中国现代中药,2014,16(2):106-108.
- [10] 陈帅,许程剑,李应彪,等. 阿魏菇多糖的结构分析[J]. 现代食品科技,2015(3):29-37.
- [11] Ge Y, Duan Y F, Fang G Z, et al. Polysaccharides from fruit calyx of *Physalis alkekengi* var. *francheti*: isolation, purification, structural features and antioxidant activities. Carbohydr Polym,2009,77(2):188-193.
- [12] 周慧吉,马海乐,郭丹钊,等. 不同体积分数乙醇沉淀桑黄胞内多糖的理化性质及抗氧化活性[J]. 食品科学,2015,36(19):34-38.
- [13] 何晋浙,邵平,倪慧东,等. 灵芝多糖结构及其组成研究[J]. 光谱学与光谱分析,2010,30(1):123-127.
- [14] 潘峰,姚芸欣,唐鑫,等. 瓦布贝母内生真菌 *Fusarium redolens* 6WBY3 多糖的理化性质及抗氧化活性[J]. 微生物学报,2017,57(2):240-253.
- [15] Chen Y, Mao W J, Yang Y P, et al. Structure and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide from coral-associated fungus, *Aspergillus versicolor* LCJ-5-4. Carbohydr Polym,2012,87(1):218-226.
- [16] 李盛,许淑琴,张俐娜. 菌类多糖链构象及其表征方法研究进展[J]. 高分子学报,2010(12):1359-1375.
- [17] 高航,高延芬,徐虹. 莲子红衣多糖的分离纯化及结构表征[J]. 食品科学,2016,37(15):94-99.
- [18] 张宁洁. 甘蓝型油菜杂交种纯度的 SSR 分子标记鉴定[J]. 贵州农业科学,2012,40(11):15-16.
- [19] Sun C P, Yuan T, Wang L, et al. Anti-inflammatory labdane-type diterpenoids from *Physalis angulata* [J]. RSC Advances,2016,6(80):76838-76847
- [20] Feng S, Jiang M, Shi Y, et al. Application of the ribosomal DNA ITS2 region of *Physalis* (Solanaceae): DNA barcoding and phylogenetic study [J]. Frontiers in Plant Science,2016(7):1047
- [21] Wang H Z, Feng S G, Lu J J, et al. Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. Scientia Horticulturae,2009,122(3):440-447.
- [22] 张自强,于肖夏,鞠天华,等. 2 个马铃薯杂交组合 F_1 的 SSR 鉴定[J]. 中国生态农业学报,2013(11):1411-1415.

(收稿日期 2018-01-30)

(上接第 1121 页)

- [12] Zhan A B, Bao Z M, Wang X L, et al. Microsatellite markers derived from bay scallop *Argopecten irradians* expressed sequence tags [J]. Fisheries Science, 2010, 71 (6): 1341-1346.
- [13] Tóth G, Gáspári Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis [J]. Genome Research,2000,10(7):967.
- [14] Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution [J]. Nature Reviews Genetics, 2004, 5 (6): 435-445.
- [15] Zhan A B, Bao Z M, Hui M, et al. Inheritance pattern of EST-SSRs in self-fertilized larvae of the bay scallop *Argopecten irradians* [J]. Annales Zoologici Fennici, 2007, 44 (4): 259-268.
- [16] 张敏,谈大明,徐长城,等. SSR 分子标记技术在茄子杂交种子纯度鉴定中的应用[J]. 湖北农业科学,2013,52(8):1959-1962.
- [17] 陆鑫,毛钧,刘洪博,等. 甘蔗野生种滇蔗茅种质创新利用

研究[J]. 甘蔗与滇蔗茅远缘杂交 F_1 群体构建与 SSR 分子标记鉴定[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(2):321-324.

- [18] 张宁洁. 甘蓝型油菜杂交种纯度的 SSR 分子标记鉴定[J]. 贵州农业科学,2012,40(11):15-16.
- [19] Sun C P, Yuan T, Wang L, et al. Anti-inflammatory labdane-type diterpenoids from *Physalis angulata* [J]. RSC Advances,2016,6(80):76838-76847
- [20] Feng S, Jiang M, Shi Y, et al. Application of the ribosomal DNA ITS2 region of *Physalis* (Solanaceae): DNA barcoding and phylogenetic study [J]. Frontiers in Plant Science,2016(7):1047
- [21] Wang H Z, Feng S G, Lu J J, et al. Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. Scientia Horticulturae,2009,122(3):440-447.
- [22] 张自强,于肖夏,鞠天华,等. 2 个马铃薯杂交组合 F_1 的 SSR 鉴定[J]. 中国生态农业学报,2013(11):1411-1415.

(收稿日期 2018-05-05)