

尖叶胡枝子种子贮藏蛋白分析

王清郦^{1,2}, 孙启忠², 赵淑芬³, 郭艳艳⁴, 周国栋¹

(1. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081; 2. 中国农业科学院草原研究所, 内蒙古 呼和浩特 010010;
3. 林西县草原工作站, 内蒙古 林西 025025; 4. 内蒙古农业大学生态环境学院, 内蒙古 呼和浩特 010019)

摘要:对3个不同类型尖叶胡枝子(*Lespedeza hedysaroides*)的种子贮藏蛋白进行SDS-PAGE比较分析。结果表明,3个不同类型尖叶胡枝子的盐溶蛋白和贮藏蛋白谱带表现出丰富的多态性,分子量10.75~154.53 KDa。盐溶蛋白的特征蛋白谱带共19条,多态性条带13条,多态率68.42%;贮藏蛋白的特征蛋白谱带共28条,其中9条为多态性条带,多态率32.14%。利用盐溶蛋白和贮藏蛋白的条带信息进行聚类分析,供试材料可分为两类:Ⅰ类为普通型和浓绿型尖叶胡枝子;Ⅱ类为高秆型尖叶胡枝子。由此认为,种子贮藏蛋白电泳技术可以作为研究胡枝子属种内变异的重要研究手段。

关键词:尖叶胡枝子;种子贮藏蛋白;SDS-PAGE

中图分类号:Q946.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0629(2012)09-1384-06

* 1

尖叶胡枝子(*Lespedeza hedysaroides*)为中旱生草本小半灌木,在森林和森林草原带的草甸草原群落中为优势种或伴生种,或为草原带的山地灌丛伴生成分,常见于草甸草原带的丘陵坡地、沙质地上或林缘^[1-2]。尖叶胡枝子具有抗旱、耐寒、耐瘠薄及适应性广等特性,是荒地造林、水土保持和土壤改良的先鋒植物,并且具有返青早、枯黄晚、叶量大、花期长、泌蜜量大、营养价值高、再生能力强、适口性好等特点,可用作饲料、薪炭林、蜜源植物和药用植物^[3-5]。

种子贮藏蛋白(Seed Storage Proteins, SSP),是指高等植物在种子成熟过程中合成并大量贮存的贮藏蛋白质,为植物的生长发育提供重要的碳源、氮源和硫源。贮藏蛋白质占种子总蛋白含量的60%~80%,豆科植物中总蛋白含量较高,已成为人类除肉类外重要的蛋白质来源^[6-8]。种子贮藏蛋白根据溶解特性可分为四大类,即溶于水的清蛋白、盐溶蛋白(包括白蛋白和球蛋白)、醇溶蛋白和溶于稀酸或稀碱溶液的谷蛋白。蛋白的组成由基因决定、几乎不受外界环境的影响,蛋白组分的差异可以反映出基因型的不同,因此,种子贮藏蛋白也被称为生化“指纹”^[9]。研究种子贮藏蛋白的方法有多种,蛋白质电泳谱带具有较高的多态性、专一性和稳定性,在植物的生化水平遗传多样性研究、品种鉴定、种群或居群

间的遗传变异以及遗传结构的研究等方面得到了广泛应用^[10-11]。十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)因其多种优良特性而得到研究者的青睐,如电泳速度只与分子量大小有关、电泳结果稳定、不受贮藏年限和外界环境影响等^[12-13]。本试验采用SDS-PAGE电泳技术对3个不同类型尖叶胡枝子的种子贮藏蛋白进行比较研究,从生化水平上探讨尖叶胡枝子的遗传多样性,从而了解胡枝子属的遗传背景,以为胡枝子属种质资源的研究和合理开发利用提供方法依据^[14]。

1 材料与方法

1.1 试验区自然概况 试验地设在赤峰市林西县城北5 km处的农研场。海拔900 m,属于半干旱大陆性季风气候;年均气温4~5℃,7月最热,平均气温20~22℃,极端最高气温40.4℃,1月最冷,平均气温-17~-13℃,极端最低气温-32.2℃,≥10℃积温2 600℃·d,年均日照时数2 985.9 h;年均降水量320~380 mm,降水主要集中在6-8月,占全年的76.7%,年蒸发量1 800 mm以上,是降水量的4.95倍;无霜期125~130 d;土壤为栗钙土。

1.2 试验材料 供试材料为尖叶胡枝子,有3个不同类型,其中一个类型是已经通过审查登记的品种科尔沁尖叶胡枝子,另外2个类型是在科尔沁尖

* 收稿日期:2011-11-21 接受日期:2012-01-09
基金项目:现代农业产业技术体系(CARS-35)建设专项资金
作者简介:王清郦(1986-),女,陕西榆林人,在读硕士生,研究方向为牧草资源利用。E-mail:wangqingli511@163.com
通信作者:孙启忠 E-mail:sunqz@126.com

叶胡枝子多年的栽培过程中发现的具有稳定遗传的种群分化类型。以科尔沁尖叶胡枝子自命名为普通型,其他两种根据形态特性自命名为浓绿型和高秆型。于2008年6月3日播种,播种量为 $6.0 \text{ kg} \cdot \text{hm}^{-2}$ 。行距45 cm,开沟溜种,覆土 $1.5 \sim 2.0 \text{ cm}$ 。苗期除草2次,播种当年浇冻水,第2年返青后除草2遍。

1.3 试验方法 采用SDS-PAGE垂直平板电泳方法,具体操作参照《蛋白质技术手册》^[15]。分别对各类种子贮藏蛋白(清蛋白、谷蛋白、醇溶蛋白和盐溶蛋白)及总贮藏蛋白进行电泳分析。

1.3.1 种子贮藏蛋白的提取 不同溶剂的蛋白质提取液配方及用量:①清蛋白提取液:去离子水,提取用量 $350 \mu\text{L}$;②盐溶蛋白提取液: $0.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_3\text{PO}_4$, $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$,pH值7.0,提取用量 $350 \mu\text{L}$;③醇溶蛋白提取液:75%乙醇溶液,提取用量 $350 \mu\text{L}$;④谷蛋白提取液:0.2%NaOH溶液,提取用量 $350 \mu\text{L}$;⑤贮藏蛋白提取液:5 mL 10%SDS,1.5 mL 2-ME,1.25 g 溴酚兰,3.44 mL 甘油,2.0 mL $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Tris-HCl}$,pH值6.8,加双蒸水定容到25 mL,提取用量 $350 \mu\text{L}$ 。

取20粒种子洗净擦干,放入研钵中研碎,置于1.5 mL离心管中,加入上述配置的蛋白提取液^[16-18] [其中盐溶蛋白在加提取液之前需要进行前处理:在加有研碎种子的离心管中加入 $200 \mu\text{L}$ 脱脂剂(氯仿:甲醇:丙酮=2:1:1),振荡混匀,常温下脱脂2 h, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,弃上清后备用,待加盐溶蛋白提取液]。室温振荡浸提2 h, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱备用。以1:1的比例加入上样缓冲液,煮沸5 min后点样。

1.3.2 SDS-PAGE 电泳 SDS-PAGE的浓缩胶浓度3%,分离胶浓度12%。各类贮藏蛋白及总的贮藏蛋白的上样量 $15 \mu\text{L}$,标准蛋白D532S(分子量 $6.5 \sim 200 \text{ kDa}$),上样量 $5 \mu\text{L}$,用北京六一电泳仪器厂生产的DYZ-28B型电泳槽,浓缩时电压恒压200 V,分离时电流恒流60 mA电泳,室温下电泳约7 h,至指示剂跑到距底部1 cm处,电泳结束后剥下胶片,染色3~10 h,脱色至条带清晰为止,照相并进行统计^[18]。

1.4 统计分析 根据SDS-PAGE电泳的特点,蛋白质的电泳迁移率主要取决于它的分子量,而与所带电荷和形状无关,单体电泳迁移率与蛋白单体分

子量的关系为:

$$\lg MW = K_1 - bm$$

式中, MW 为蛋白单体分子量, m 为蛋白单体迁移率, K_1 和 b 为常数。

蛋白质相对迁移率(Rf)=

$$\frac{\text{脱色后蛋白质移动距离} \times \text{染色前分离胶长}}{\text{染色前指示剂移动距离} \times \text{脱色后分离胶长}}$$

通过已知分子量的标准蛋白(Protein Marker)在相同电泳条件下的迁移率,绘制出分子量与迁移率的标准曲线,然后计算供试材料的蛋白单体迁移率和分子量。对清晰蛋白质条带的有无进行标记,有为1,无为0,得出(0,1)矩阵。利用Popgene 1.31软件进行Nei's遗传距离(D)和遗传一致度(I)分析。利用NTSYS-pc 2.1系统进行聚类分析^[19]。通过SAS软件对不同提取液做差异显著性检验。

2 结果与分析

利用SDS-PAGE电泳技术对3个不同类型的尖叶胡枝子种子贮藏蛋白进行电泳,获得清晰稳定的遗传蛋白图谱(图1)。

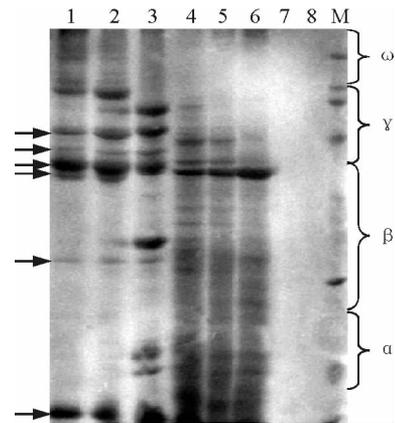


图1 3个不同类型尖叶胡枝子的蛋白电泳图谱
Fig. 1 Electrophoregrams of seed storage proteins of three *Lespedeza hedysaroides*

注:M为标准蛋白,1~3为盐溶蛋白谱带,4~6为贮藏蛋白谱带,7、8为提取液空白对照;1、4为普通型,2、5为浓绿型,3、6为高秆型,7为盐溶蛋白对照,8为贮藏蛋白对照;→表示表达量100%条带。

Note: M, Protein Marker; 1~3, salt-soluble proteins; 4~6, seed storage proteins; 7 & 8, control of extracts; 1 & 4, common-type; 2 & 5, deep green-type; 3 & 6, tall-type; 7, control of salt-soluble proteins; 8, control of seed storage protein; →, bands with 100% expression.

2.1 清蛋白、谷蛋白和醇溶蛋白电泳结果 经电泳染色、脱色后,点样孔加入清蛋白和谷蛋白的泳道无清晰谱带出现,点样孔加入醇溶蛋白的泳道中出现几条痕迹很浅的条带。

2.2 盐溶蛋白谱带遗传多样性分析 3份供试材料的盐溶蛋白质谱带存在差异,共检测出19条蛋白谱带,其中6条谱带为稳定表达谱带,表达率为100%;其余13条为不同程度表达的多态性谱带,多

态性数目占总条带的68.42%。把整个蛋白谱带划分为4个区域:α区、β区、γ区和ω区,其中α区相对迁移率为0.7~1.0,β区相对迁移率为0.3~0.7,γ区相对迁移率为0.1~0.3,ω区相对迁移率为0~0.1。盐溶蛋白的各区域均有条带出现,其中α区有4条,β区有6条,γ区有6条,ω区有3条,分子量大小13.57~154.53 KDa(表1)。

计算3个不同类型尖叶胡枝子盐溶蛋白的

表1 3个不同类型尖叶胡枝子盐溶蛋白电泳出现频率和蛋白分子量

Table 1 Frequency of bands and molecular weight of salt-soluble protein of three *L. hedysaroides*

位点 Loci	出现频率 Frequency	相对迁移率 Rf	分子量 Molecular weight/KDa	位点 Loci	出现频率 Frequency	相对迁移率 Rf	分子量 Molecular weight/KDa
1	0.67	0.05	154.53	11	1.00	0.34	67.05
2	0.67	0.07	144.90	12	0.33	0.35	64.88
3	0.67	0.09	137.83	13	0.37	0.38	60.75
4	0.67	0.11	129.15	14	0.54	0.54	38.06
5	0.47	0.13	120.93	15	1.00	0.60	32.57
6	0.67	0.16	112.34	16	0.81	0.73	22.55
7	1.00	0.20	100.13	17	0.67	0.81	17.76
8	1.00	0.26	85.01	18	0.33	0.85	15.73
9	1.00	0.28	79.65	19	0.33	0.91	13.57
10	1.00	0.31	74.58				

Nei's的遗传距离和遗传一致度(表2),普通型与浓绿型的遗传距离最小,为0.0213;普通型与高秆型的遗传距离最大,为1.0355。高秆型与普通型的遗传一致度最小,为0.3551,浓绿型与普通型的遗传一致度最大,为0.9789。

表2 盐溶蛋白 Nei's 遗传一致度(右上角)和遗传距离(左下角)

Table 2 Nei's of genetic identity (upper right corner) and genetic distance (lower left corner) of salt-soluble protein

类型 Type	普通型 Common-type	浓绿型 Deep green-type	高秆型 Tall-type
普通型 Common-type	* * * *	0.978 9	0.355 1
浓绿型 Deep green-type	0.021 3	* * * *	0.406 4
高秆型 Tall-type	1.035 5	0.900 5	* * * *

根据3份供试材料的遗传距离和遗传一致度信息聚类得到聚类图(图2)。1(普通型)与2(浓绿型)之间距离系数为0.00,聚为一类;1、2与3(高秆型)的距离系数为0.56,3单独聚为一类。

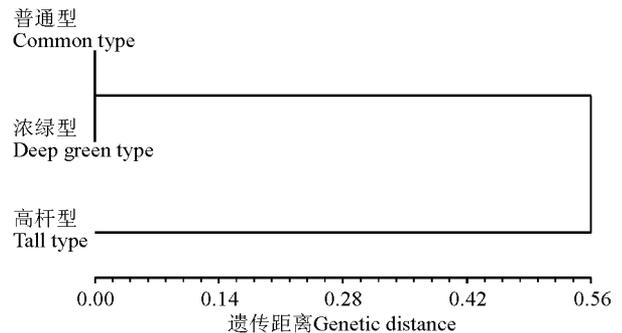


图2 3个不同类型尖叶胡枝子的盐溶蛋白聚类图
Fig. 2 Dendrogram based on Nei's genetic distance of salt-soluble proteins

2.3 贮藏蛋白谱带遗传多样性分析 3份供试材料之间的贮藏蛋白质谱带存在差异,共检测到28条蛋白谱带,其中19条谱带为稳定表达谱带,表达

表3 3个不同类型尖叶胡枝子贮藏蛋白电泳出现频率和蛋白分子量

Table 3 Frequency of bands and molecular weight of storage protein of three *L. hedysaroides*

位点 Loci	出现频率 Frequency	相对迁移率 Rf	分子量 Molecular weight/KDa	位点 Loci	出现频率 Frequency	相对迁移率 Rf	分子量 Molecular weight/KDa
1	0.46	0.17	107.78	15	1.00	0.39	58.07
2	0.73	0.19	101.72	16	0.62	0.40	56.19
3	0.67	0.22	93.69	17	1.00	0.43	51.79
4	1.00	0.25	87.79	28	1.00	0.47	46.56
5	1.00	0.26	84.22	19	1.00	0.52	40.82
6	0.67	0.27	82.14	20	0.81	0.55	37.30
7	1.00	0.28	80.17	21	1.00	0.57	34.98
8	1.00	0.31	76.25	22	1.00	0.59	33.30
9	1.00	0.32	71.96	23	1.00	0.61	31.47
10	0.81	0.33	68.50	24	0.33	0.72	23.27
11	1.00	0.35	66.24	25	1.00	0.75	20.92
12	0.62	0.36	64.05	26	1.00	0.82	17.33
13	1.00	0.37	61.49	27	1.00	0.88	14.79
14	1.00	0.38	60.01	28	1.00	0.94	12.43

率为100%；剩余9条为不同程度表达的多态性谱带，多态率32.14%。α区有5条，β区有16条，γ区有7条，ω区无谱带出现，分子量大小12.43~107.78 KDa。

计算3个不同类型尖叶胡枝子贮藏蛋白的Nei's遗传距离和遗传一致度(表4)，普通型与浓绿型的遗传距离最小，为0.0251；普通型与高杆型的遗传距离最大，为0.2382。高杆型与普通型的遗传一致度最小，为0.7880；浓绿型与普通型的遗传一致度最大，为0.9752。

表4 贮藏蛋白Nei's遗传一致度(右上角)和遗传距离(左下角)

Table 4 Nei's of genetic identity (upper right corner) and genetic distance (lower left corner) of seed storage protein

类型 Type	普通型 Common-type	浓绿型 Deep green-type	高杆型 Tall-type
普通型 Common-type	* * * *	0.975 2	0.788 0
浓绿型 Deep green-type	0.025 1	* * * *	0.811 9
高杆型 Tall-type	0.238 2	0.208 4	* * * *

根据3份供试材料的贮藏蛋白聚类结果可知(图3)，1(普通型)与2(浓绿型)之间距离系数为0.02，聚为一类；1、2与3(高杆型)的距离系数为0.10，3单独聚为一类。

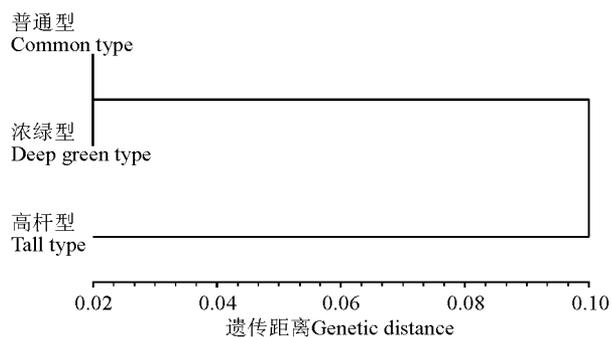


图3 3个不同类型尖叶胡枝子的贮藏蛋白聚类图
Fig. 3 Dendrogram based on Nei's genetic distance of seed storage protein

2.4 不同提取液的遗传系数方差分析 对盐溶蛋白和贮藏蛋白提取液的遗传距离和遗传一致度进行方差分析，结果显示两种提取液的遗传系数之间没有显著差异(P>0.05)。

3 讨论与结论

蛋白质作为基因表达的直接稳定产物，能在生化水平上反映DNA组成上的差异，种子贮藏蛋白

在种子细胞内的积累、含量高低及组分的变化受相关基因的严格调控^[20]。因此,种子贮藏蛋白被广泛应用于种质资源的研究中,包括新品种登记和保护、品种亲缘关系和分类研究以及构建蛋白质指纹图谱等方面^[21-22]。赵杨等^[16]通过对二色胡枝子(*L. bicolor*)种子贮藏蛋白的研究发现,14个居群贮藏蛋白电泳总谱带数为28条,总多态带为23条,多态带率82.14%,胡枝子总遗传多样性指数为0.255,居群内平均遗传多样性指数为0.136,占总遗传多样性指数的53.33%,说明居群内变异是胡枝子基因结构变异的主要来源。此外,各居群间也存在较高的遗传分化。闫伟红等^[18]通过对40个野生居群的胡枝子属植物种贮藏蛋白研究表明,供试材料的种贮藏蛋白谱带的多态性达90.6%,这说明胡枝子属植物无论在种间还是种内都具有丰富的蛋白质多态性。通过对胡枝子属的蛋白质电泳研究可以发现,遗传变异大多来自胡枝子属种内或居群间,推断导致遗传变异的可能原因是长期生物进化而积累的遗传物质的变异以及由于优胜劣汰而逐渐适应生境的不同生态型之间的差异。

对3个不同类型尖叶胡枝子的蛋白电泳谱带位点进行统计,不同提取液所获得的蛋白谱带各不相同。其中使用去离子水和0.2%NaOH溶液提取的尖叶胡枝子种子清蛋白和谷蛋白几乎没有或者含量甚微,使用75%乙醇溶液提取的尖叶胡枝子种子醇溶蛋白含量较少,在此不做详细讨论。利用盐溶蛋白和贮藏蛋白提取液所得的总蛋白谱带的分子量介于12.43~154.53 KDa,相对迁移率0.05~0.94。从电泳结果可以看出,盐溶蛋白的 γ 区域是谱带颜色、宽窄和多态性位点差异最明显的区域; β 区是贮藏蛋白均匀表达稳定且集中的区域, γ 区是谱带多态性位点出现差异的区域^[23-24]。盐溶蛋白的蛋白谱带总数为19条,多态率为68.42%,贮藏蛋白的为28条,多态率为32.14%,说明3份材料的盐溶蛋白的条带位点少于贮藏蛋白而种内变异大于贮藏蛋白。聚类结果表明,利用盐溶蛋白和贮藏蛋白获得的蛋白质图谱能很好地区分鉴别3个不同类型的尖叶胡枝子,通过对盐溶蛋白和贮藏蛋白的遗传一致度进行方差分析,结果显示两者之间没有显著差异。

供试材料分为两类:一类为普通型和浓绿型尖叶胡枝子;另一类为高秆型尖叶胡枝子,这从生化水平上证明高秆型尖叶胡枝子是尖叶胡枝子的种内变异种。盐溶蛋白是豆科植物种子中主要的贮藏蛋白质^[25],且谱带的多态性和分辨率较高,建议使用盐溶蛋白对胡枝子属植物的种内(居群内)变异进行遗传多样性进行研究,效果更好。

参考文献

- [1] Pirie N W. Leaf Protein and Its By-product in Human and Ani-mal Nutrition[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1987: 125-138.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第四十一卷[M]. 北京: 科学技术出版社, 1995: 131-158.
- [3] 孙启忠, 韩建国, 桂荣, 等. 科尔沁沙地达乌里胡枝子生物量研究[J]. 中国草地, 2001, 21(4): 21-26.
- [4] 内蒙古植物志编委委员会. 内蒙古植物志[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1989: 347-358.
- [5] 马彦军, 曹致中, 李毅. 胡枝子属植物研究进展[J]. 草业科学, 2010, 27(10): 128-134.
- [6] 韩宝达, 李立新. 植物种子贮藏蛋白质及其细胞内转运与加工[J]. 植物学报, 2010, 45(4): 492-505.
- [7] Fuji K, Shimada T, Takahashi H, et al. *Arabidopsis* vacuolar sorting mutants (green fluorescent seed) can be identified efficiently by secretion of vacuole-targeted green fluorescent protein in their seeds[J]. Plant Cell, 2007, 19: 597-609.
- [8] Duranti M, Consonni A, Magni C, et al. The major proteins of lupin seed: characterization and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients[J]. Trends in Food Science & Technology, 2008, 19: 624-633.
- [9] 兰海燕, 李立会. 蛋白质凝胶电泳技术在作物品种鉴定中的应用[J]. 中国农业科学, 2002, 35(8): 916-920.
- [10] 夏兰琴, 蒋尤泉, 阎福林. 扁蓿豆遗传多样性的研究[J]. 中国草地, 1997(2): 30-35.
- [11] 郭江波, 赵来喜. 中国苜蓿育成品种遗传多样性及亲缘关系研究[J]. 中国草地, 2004, 26(1): 9-14.
- [12] Webfr K, Osborn M. Proteins and sodium dodecyl sulfate, molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures [A]. The Proteins [M]. New York: Academic Press, 1975: 180-206.

- [13] 李拥军,苏加楷. 中国苜蓿地方品种亲缘关系的研究[J]. 草业学报,1999,8(1):31-41.
- [14] 黄秀丽,庄东红,胡忠,等. 南瓜属4个栽培种种子蛋白质电泳分析[J]. 武汉植物学研究 2005,23(2):183-187.
- [15] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社,2008:77-90.
- [16] 赵杨,骈瑞琪,陈晓阳,等. 二色胡枝子种子储藏蛋白多样性研究[J]. 西北植物学报,2007,27(9):1767-1771.
- [17] 孙雁,朱有勇,朱永平,等. 蛋白质电泳在豌豆品种鉴定中的应用[J]. 种子,2004,23(2):24-26.
- [18] 闫伟红,徐柱,师文贵,等. 胡枝子属植物40个野生居群种子蛋白谱带多样性研究[J]. 草业科学,2007,24(5):58-63.
- [19] 刘晓云,戴燕燕,郭振国,等. 三叶草根瘤菌 SDS-PAGE 分析及结瘤试验分子验证[J]. 草业科学,2010,27(1):79-84.
- [20] Kim W T, Okita T W. Expression of storage protein multigene families in developing rice endosperm[J]. Plant cellphysiol,1993,34(4):374-378.
- [21] Huaman Z, Stegemann H. Use of electrophoresis analyses to verify morphologically identical clones in a potato collection [J]. Plant Varieties and Seeds, 1989(2):155-161.
- [22] 颜启传,邓光联,支巨振. 农作物品种电泳鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1998:1-8.
- [23] 葛荣朝,赵宝存,李薇. 利用盐溶蛋白 PAGE 电泳法检测玉米种子的研究[J]. 华北农学报,2007,22(4):91-93.
- [24] 王丽,张守华,陈新民. 盐溶蛋白电泳鉴定玉米种子纯度的图谱分析[J]. 种子科技,2003(5):191-192.
- [25] 王文军,景新明. 种子蛋白质与蛋白质组的研究[J]. 植物学通报,2005,22(3):257-266.

Analysis on seed storage protein of *Lespedeza hedysaroides*

WANG Qing-li^{1,2}, SUN Qi-zhong², ZHAO Shu-fen³,
GUO Yan-yan⁴, ZHOU Guo-dong¹

- (1. Graduate School Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;
2. Institute of Grassland Research of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Huhhot 010010, China;
3. Station of Grassland Work, Linxi County, Linxi 025250, China;
4. Inner Mongolia Agricultural University, Ecological Environment Institute, Hohhot 010019, China)

Abstract: Seed storage proteins of three *Lespedeza hedysaroides* were analyzed by SDS-PAGE technique. Results indicated that SDS-PAGE of salt-soluble proteins and seed storage proteins were practical and reliable methods for determining relationships among three *L. hedysaroides*. Salt-soluble protein and seed storage protein in the common-type and deep green-type *L. hedysaroides* were significantly different from those in the tall-type. The protein molecular weight ranged from 10.375 KDa to 155.53 KDa. 6 bands were shared and 13 bands were polymorphism (68.42%) of total 19 salt-soluble protein bands. 19 bands were shared and 9 bands were polymorphism (32.14%) of total 28 seed storage protein bands. Clustering showed that three *L. hedysaroides* were divided into two groups. The common-type and the deep green-type were classified as the first group and the tall-type one was second group. Therefore, SDS-PAGE technology is an important method to study intraspecies variation among *Lespedeza* species.

Key words: *Lespedeza hedysaroides*; seed storage protein; SDS-PAGE