

10 月上旬收获,这两季种植可获得 1.5 kg/m² 益母草。此外,9 月下旬或 10 月上旬播种,12 月下旬至 2 月下旬收获,可作为春化作物的补充,但这一季种植必须建立在暖冬的气候条件下或大田塑料薄膜覆盖保温。

参 考 文 献

1 中国医学科学院药用植物资源开发研究所主编. 中国药用植物栽培学. 北京: 农业出版社, 1991: 1065
2 盛束军, 等. 植物资源与环境, 1998, 7(1): 31

3 赵增煜主编. 常用农业科学试验法. 北京: 农业出版社, 1986: 12, 46
4 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典. 一部. 广州: 广州科技出版社, 1965: 261
5 G.R. 沃勒, 等著. 朱太平, 等译. 生物碱的生物学及其在植物中的代谢作用. 北京: 科学出版社, 1984: 89
6 刘玉亭. 中药通报, 1987, 12(9): 14
7 盛束军, 等. 生命科学探索与进展(下册). 杭州: 杭州大学出版社, 1998: 632

(1999-06-25 收稿)

金钱白花蛇可溶性蛋白凝胶电泳图谱的研究

湖北中医学院药系(武汉 430061) 陈振江* 陈科力 王 曦** 吴和珍
湖北荆州市第一人民医院药学部 姚明全

摘 要 对金钱白花蛇进行几种凝胶电泳研究,根据聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)谱带的位置和数目进行品种鉴别;用改进的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测定其主要蛋白质成分分子量;用等电聚焦电泳(IFE)测定其主要蛋白质成分的等电点(PI)。清晰的电泳谱带及相应数据为商品蛇真伪鉴别提供了科学依据。
关键词 金钱白花蛇 PAGE SDS-PAGE IFE

Studies on Gel Electrophoresis Atlas of Soluble Protein in *Bungarus*

Department of Pharmacy, Hubei College of TCM (Wuhan 430061) Chen Zhenjiang, Chen Keli, Wang Xi and Wu Hezheng

Department of Pharmacy, Jingzhou No. 1 Peoples's Hospital Yao Mingquan

Abstract Disc polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE) was performed to detect systematically the soluble proteins in *Bungarus*. Different species were identified according to the position and number of PAGE bonds. Molecular weights of the soluble proteins were measured by a modified sodium dodecyl sulfonate (SDS) procedure. Isoelectric focusing electrophoresis (IFE) was used to determine the isoelectric point of the main protein of *Bungarus*. Results showed that the IFE band were always quite distict, which can be used as a scientific basis to distinguish the genuine snakes from its confusable or faked varieties.
Key words *Bungarus* polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) sodium dodecyl sulfonate (SDS) isoelectric focusing electrophoresis (IFE)

蛇类药材种类很多,其中金钱白花蛇为贵重药材,时有伪品现象发生。传统的鉴别主要依据药材的外形、鳞片、色斑、骨骼及某些器官的特征。目前,商品蛇中常见用游蛇科或其它科的幼蛇充真,本文采用 PAGE 技术鉴别金钱白花蛇的品种;用改进的 SDS-PAGE 技术测定金钱白花蛇蛋白质成分分子量,用 IFE 技术测定金钱白花蛇蛋白质成分等电点(PI)、结果满意,从而为蛇类药材及其制剂的生产、

贮藏提供有价值的参考数据和图谱。

1 实验材料

- 1.1 水赤链游蛇: *Natrix annularis* (Hallowell). 幼蛇。
1.2 金钱白花蛇: 为眼镜蛇科动物银环蛇 *Bungarus multicinctus* Blyth 幼蛇(购自湖北省中药材公司)。
1.3 黄链蛇: 为游蛇科动物黄链蛇 *Dinodon*

* Address: Chen Zhenjiang, Department of Pharmacy, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan
陈振江 1953 年 8 月出生。武汉大学化学学院毕业,现任湖北中医学院药系副教授、药系基础实验室主任兼基础课教研室副主任。主要从事中药新剂型研究开发和中药及制剂质量分析。在国家级学术期刊上发表论文 20 多篇。有多篇论文获奖(包括美国柯尔比科学文化信息中心医学部优秀论文奖及湖北省 98' 优秀自然科学论文一等奖),并被《美国化学文摘》、《中国药学文摘》等刊物录用。
** 武汉市一医院药剂科
湖北省教委自然科学基金项目

flavozonatum Pope 幼蛇。

1 和 3 两种样品由湖北省中医学院鉴定教研室提供并经陈科力副教授鉴定。

2 实验仪器

DYY-4 型电泳仪, DYY-27A 型圆盘电泳槽、TGL-16C 台式高速离心机。所用试剂均为 AR 级、双蒸水。

3 PAGE

3.1 试剂的配制^[1]: 参照文献 1 的方法进行。所配各种试剂均应置于 4℃ 下贮存备用。

3.2 样品液的制备^[2]: 取样品各 0.2 g 分置于不同的研钵中, 各加入 1 mL 生理盐水研磨成匀浆, 以 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 各加入 1 倍量丙酮萃取, 再将萃取液分置于半透膜袋透析 48 h (其间更换蒸馏水数次), 置冰箱中备用。

3.3 电泳分析: 取样品上清液加入 1/2 体积的 40% 蔗糖溶液, 用微量进样器在凝胶管中点样, 点样量为 50 μ L。在上电泳槽中加入 2~3 滴溴酚蓝指示剂示踪。电泳开始时电流控制 2 毫安/管, 待样品进入分离胶后加大为 3 毫安/管, 当指示剂行至末端约 1 cm 处时停止电泳。取出胶条, 经染色与脱色处理后结果见图 1。

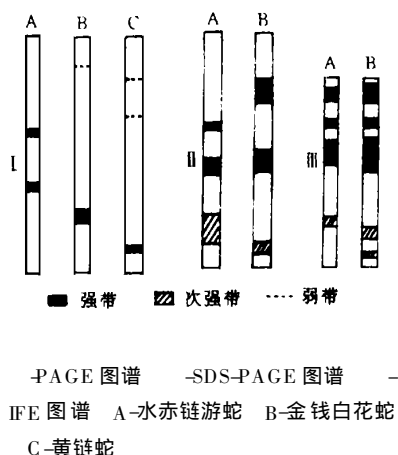


图 1 电泳图谱

4 SDS-PAGE

4.1 试剂配制^[3]: 参照文献^[3]的方法进行。

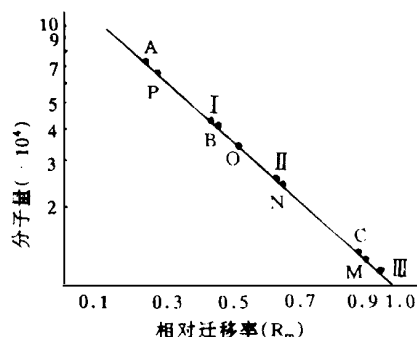
4.2 样品液制备: 取样品各 0.2 g, 切碎分置于 10 mL 烧杯中加入适量乙醚浸泡脱脂, 待有机溶剂挥发后转置于 10 mL 离心管(带塞)中各加水 1 mL, 超声振荡 30 min, 以 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液将其与水解液按 1:2 混匀, 置冰箱中过夜得样品处理液。取样品处理液 0.4 mL 加 0.05% 溴酚蓝和甘油各 0.05 mL 混匀即得点样用样品液。

4.3 电泳分析: 凝胶柱的制备, 将凝胶母液、凝胶缓

冲液、双蒸水、过硫酸铵(16 mg/mL)、四甲基乙二胺按 10.1:15:3.4:1.5:0.045 的比例配成溶液, 注入已处理好的玻管中静置聚合 30 min 即可。然后, 取样品液 0.1 mL, 小心点入已吸去水层的凝胶柱顶端, 并在上电泳槽电极缓冲液中滴 2~3 滴溴酚蓝示踪电泳即可开始。电流控制 8 毫安/管, 待示踪剂行至凝胶末端约 1 cm 处时停止电泳, 取出胶条(注意编号)用卡尺精确测量各胶条的长度。经染色、脱色后再测量各胶柱长度。

4.4 标准蛋白的电泳与 3 同时同一电泳槽中进行, 编号分别是 M(核糖核酸酶 MW 13 500)、N(糜蛋白酶原 MW 25 000)、O(胃蛋白酶 MW 35 000)、P(牛血清蛋白 MW 67 500)。

4.5 样品电泳图谱及标准蛋白相对迁移率 R_m 与分子量的关系如图 1, 图 2 所示。



M-核糖核酸酶(MW=13 500); N-糜蛋白酶原(MW=25 000); O-胃蛋白酶(MW=35 000) P-牛血清蛋白(MW=67 500)

图 2 用低分子量标准蛋白质所作的标准曲线

相对迁移率 R_m 与样品主要蛋白质成分的分子量的求法是:

$$R_m = \frac{\text{蛋白移动距离}}{\text{脱色后的胶长}} \times \frac{\text{染色前的胶长}}{\text{染料移动距离}}$$

以上 R_m 为横坐标, 已知分子量的标准蛋白的对数为纵坐标, 在半对数坐标纸上绘制如图 2 所示的标准曲线图。图中 M、N、O、P 代表各标准蛋白。

5 IFE^[4]

5.1 试剂的配制与凝胶的制备: 参照文献^[4]的方法进行, 所用两性电解质为瑞典 LKB 公司 Ampholyte 1809-101, pH=3.5~10, 并制备两支空白凝胶。

5.2 样品液的制备: 参照前述 4 的方法操作。样品称重 0.5 g。

5.3 等电聚焦: 按文献^[4]的方法操作。

5.4 固定及空白管 pH 梯度的测定: 电泳结束后, 取出各凝胶管(注意标记好管的上下端)用蒸馏水洗

涤凝胶两端和玻管外壁,随后取出胶条并精确测量各样品胶柱长度后置于固定液中固定 40 min,则各样品胶柱上会呈现清晰的乳白色 IFE 谱带,见图 3。将空白胶柱(不经固定)按 0.5 厘米/段切成若干段,分置于已编号并各盛有 1 mL 蒸馏水的 5 mL 的试管中 4 下浸泡 1 h,用精密 pH 试纸测定各段浸泡液的 pH 值。以各段空白胶条所在位置(即胶柱长度)为横坐标,以相对应的浸泡液的 pH 值为纵坐标作图可得到 IFE 的 pH-胶柱长度关系曲线如图 3 所示。

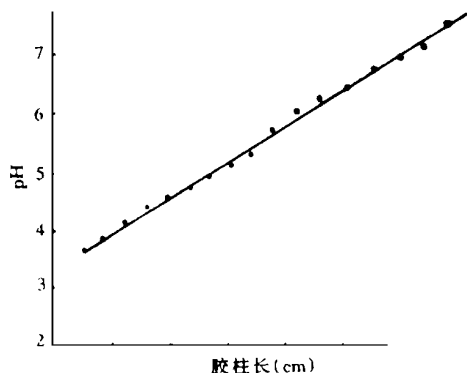


图 3 IFE pH-胶柱长度关系曲线

因胶柱经固定后其长度会发生变化,故由 pH-胶柱长度关系曲线求被测样品所含主要蛋白质成分的 PI 值,所用长度是经校正后的长度:

$$\text{胶柱长度} = \text{蛋白质迁移距离} \times \frac{\text{原胶柱长(未经固定)}}{\text{现胶柱长(经固定后)}}$$

根据各样品在各自 IFE 胶柱上的谱带位置(经校正后)再分别与 pH-胶柱长度关系曲线对比,可方便得到各样品蛋白质成分的 pH 值。

6 结论与讨论

6.1 PAGE、SDS-PAGE、IFE 图谱及有关数据图如图 1~图 3 所示。

6.2 动物类中药材含蛋白质成分较丰富。对金钱白花蛇进行 PAGE、SDS-PAGE 及 IFE 的系统研究尚属首次,结果都取得了令人满意的清晰的电泳谱带。经重复实验证明 3 种凝胶电泳的结果重现性良好。

6.3 常规 PAGE 根据谱带位置与数目的不同,即可进行蛇类的品种鉴别。由图 1 知:正品只有一个明显的主带。

6.4 改进的 SDS-PAGE 技术可精确测定金钱白花蛇主要蛋白质成分的分子量。如图 2 所示:图中、为样品 1 所含主要蛋白质成分分子量在标准曲线上所对应的位置,其相应的分子量是:

(42 000)、(26 000)、(11 000)。A、B、C 为样品 2

所含主要蛋白质分子量在标准曲线上所对应的位置。其相应的分子量是: A (71 500)、B (41 500)、C (14 000)。

6.5 高效的 IFE 技术可测定金钱白花蛇主要蛋白质成分的 PI 值,例如:由图 1 和图 3 可方便地确定各样品的蛋白质成分的 PI 值。样品 1 蛋白质成分的 PI 值依次为 7.9、7.3、6.8、4.5;样品 2 蛋白质成分的 PI 值依次为 8.0、7.4、7.0、3.9、3.7。从中可知金钱白花蛇的主要蛋白质成分在偏碱性区。其 IFE 谱带数目也较伪品蛇多。

6.6 以上实验所得图谱及相应数据,可为金钱白花蛇及其它蛇类药材的生产、贮藏和相应制剂的质量保证提供可靠的参考标准和数据。

6.7 聚丙烯酰胺的纯度(必要时使用前应提纯或配制溶液时要过滤)、待测样品液的脂、盐含量均对各电泳过程产生影响。例如,样品液中脂盐的存在会使胶柱的介电常数偏高,导致电泳过程中出现温度异常升高、胶条烧焦,甚至出现闪电火花并击穿凝胶管。此外,样品液脱脂脱盐不彻底则 PAGE 和 SDS-PAGE 谱带不清晰或产生“拖尾”,并对 IFE 中胶柱的“平滑”的 pH 梯度形成造成不利影响。本实验研究中样品的脱脂脱盐处理,目的就在于消除不利影响以获得理想的各种电泳图谱。

6.8 SDS 是阴离子型表面活性剂,它能按一定比例与蛋白质分子结合成带负电荷的复合物,其负电荷远远超过了蛋白质原有的电荷差别,这样就使蛋白质 R_m 只取决于分子大小这样一个因素,故可根据标准蛋白质分子量的对数与迁移率所作的标准曲线,求得未知物(或待测物)的分子量。鉴于各种来源的蛋白质几乎都能迅速地被 SOD 溶解,故 SDS-PAGE 技术可用于富含蛋白质成分的动物类中药作成分分析或鉴别。由图 2 可知:正品与伪品的 SDS-PAGE 图谱完全不同。说明尽管伪品蛇的外观与正品蛇极为相似,但由于它们属于不同的品种,所以其蛋白质成分的分子量及分子大小完全不一样。由图 3 可知:实验选用的 4 种标准蛋白质的“对数分子量-蛋白质分子 R_m ”线性关系良好($r = 0.9998$),且分子量的范围基本满足测定需要,待测品的分子量基本上都落在此线性范围内,这也正是我们进行此项研究的必须条件之一。此外,蛋白质结合 SDS 的量,受溶液 pH、离子强度、缓冲溶液组分的影响。所以,用 SDS-PAGE 测定蛋白质分子量时,除了所用试剂要纯外还应在统一的实验条件下进行。否则,同一种蛋白质在不同条件下结合的 SDS 量是不同

的,而不同的 SDS 含量将会使蛋白质在电泳中产生不同的泳动度。

6.9 IFE 中两性电解质的加入是为了在电泳支持物上产生“平滑”的 pH 梯度,实践证明,只有在“平滑”的 pH 梯度的胶柱上,才能获得分辨率理想的 IFE 谱带。实际应用中,为简化操作和节省价格昂贵的两性电解质用量,同时满足“平滑”pH 梯度形成的需要,可在 pH=3.5~10 的两性电解质中加入占载体总量 10% 的 pH=5~7 的两性电解质。此外,IFE 中将样品液混入凝胶液中的加样方法既可简化操作,加大点样量,同时依据 IFE 技术特点,还可避免样品在胶柱中单独占据的一段 pH 梯度,从而扩大电泳分离范围,提高分辨率并缩短电泳时间。另一方面,由图 1 可知:正品蛇与伪品蛇的 IFE 谱带尽

管它们的主带数目相同,但它们的 IFE 弱带正品蛇多于伪品蛇,且正品蛇的几个主带宽度几乎均大于伪品蛇的宽度,说明这些主带的 PI 值是不同的。图 3 是将胶条按 0.5 米/段切割而得到的 pH-胶柱长度的关系曲线。实际应用中欲作更精密的测定,胶条在电泳结束后可作染色、脱色处理,同时胶段应切割得更小并采用袖珍型 pH 计测定各胶段浸泡液的 pH 值。

参 考 文 献

- 1 袁晓华,等编著.植物生理生化实验.北京:高等教育出版社,1983:36,50
- 2 陈振江,等.中成药,1996,18(5):42
- 3 徐康森,等.药物分析杂志,1982,2(4):193
- 4 陈振江,等.中成药,1998,20(12):31

(1999-07-16 收稿)

榧子蛋白高效毛细管电泳法鉴别

第一军医大学南方医院(广州 510515) 陈振德* 陈志良 侯连兵 许重远 郑汉臣**

摘 要 对国产榧属植物种子进行蛋白电泳鉴别。采用高效毛细管电泳法对榧属植物种子蛋白进行分析。榧属植物种子蛋白高效毛细管电泳谱图有明显的种间差异。高效毛细管电泳可作为中药榧子的鉴别方法。

关键词 榧子 高效毛细管电泳 生药鉴别

Identification of Proteins from the Kernel of *Torreya* (*Torreya* Arn.) Nut by HPCE

Nanfeng Hospital, the First Military Medical University (Guangzhou 510515) Chen Zhende, Chen Zhiliang, Hou Lianbing, Xu Chongyuan and Zheng Hanchen

Abstract To identify the proteins obtained from different species of *Torreya* Arn. nuts by HPCE, in order to distinguish their various origins. Results showed that the electrophorograms did show some differences which could be used for the pharmacognostic identification of *Torreya* Arn.

Key words *Torreya* Arn. nut HPCE pharmacognostic identification

红豆杉科榧属植物 *Torreya* Arn. 全世界有 8 种和 8 个栽培品种,我国有 5 种,8 个栽培品种及 1 个引进栽培种^[1,2]。该属植物种子均富含优质脂肪油,可供食用或工业用^[1~3]。其中,榧子始载于《神农本草经》,历版《中国药典》均收载,具有杀虫、消积、润肠、通便之功效。经笔者调查发现,云南榧子、巴山榧子等在产地也作为榧子应用,而《中国药典》对榧子只有性状描述,没有较理想的鉴定方法。我们拟以

中药材细胞中普遍存在的、受遗传基因控制的蛋白分子为指标,用高效毛细管电泳(HPCE)法来探索鉴别中药榧子的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料:榧子 *Torreya grandis*, 香榧子 *T. grandis* cv. *merrillii* 于 1996 年 9 月 27 日采自浙江诸暨,采集人陈振德;九龙山榧子 *T. jiulongshanensis* 于 1997 年 9 月 28 日采自浙江遂昌,采集人傅秋华;长叶榧子 *T. jackii* 于 1997 年 9 月 24 日采自浙江仙

* Address: Chen Zhende, Nanfang Hospital of the First Military Medical University, Guangzhou

陈振德 男,博士、副教授、副主任药师、硕士生导师。1984 年大学毕业,1998 年博士毕业。曾从事叶绿素主要降解产物紫红素 18、二氢卟吩 P₆及其衍生物的制备与肿瘤光生物活性和保肝作用的研究,此成果正在申请两项发明专利。攻读博士学位期间主要从事中国榧属植物资源、化学和药理的研究。发表论文 20 余篇,参编 2 部专著,已申请发明专利 1 项,《大蒜除臭新工艺》获军队科技进步二等奖。《中国榧属植物资源、化学成分和药理活性的研究》获 2000 年度国家自然科学基金资助,批准号:39970893。《中药复方防治术后腹膜粘连的新药研究》获 2000 年度国家新药研究基金资助,批准号:96-901-05-245。现主要从事中药材鉴定、资源及天然药物化学等方面的研究工作。

** 第二军医大学药学院