

桃仁蛋白梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳的研究

张 波¹, 谭 峰¹, 唐金强², 黄开颜³, 张克纯^{1*}

(1. 湖南中医学院 基础部生物化学教研室, 湖南 长沙 410007; 2 湖南中医学院 基础部中医诊断研究所, 湖南 长沙 410007; 3. 湖南中医学院第一附属医院 药剂科药检室, 湖南 长沙 410007)

电泳作为一种分离蛋白质的手段已是含蛋白中药材鉴定的常用方法。聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 是利用丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺聚合形成的立体网状物作为载体对不同的带电物质进行分离的电泳方法。梯度 PAGE 是 PAGE 的改进方法, 可用来将不同大小的蛋白质分开, 配合标准相对分子质量蛋白可以对待测蛋白质进行相对分子质量测定。从已有的资料来看, 用于鉴定的电泳方法有平板 PAGE^[1], 圆盘 PAGE^[2], SDS-PAGE^[3], 高效毛细管电泳^[4], 同功酶等电聚焦^[5], 醋酸纤维薄膜电泳^[6]等。到目前为止, 还未见用梯度 PAGE 法进行中药鉴定的报道, 为此, 作者对 3 种不同来源桃仁的蛋白质利用梯度 PAGE 进行比较分析。

1 实验部分

1.1 仪器与设备: DYY-III-8B 电泳仪, DYY-III-28B 电泳槽, HL-1 恒流泵, TH-1 梯度混合器, TGL-16 离心机。

1.2 实验材料: 1 号桃仁取材于湖南中医学院第一附属医院药房, 经鉴定来源于蔷薇科植物山桃 *Prunus davidiana* (Carr.) Franch. 的成熟种子经机械去皮所得。2 号桃仁采集于湖南安乡, 为桃 *P. persica* (L.) Batsch 的成熟种子去皮所得, 3 号桃仁采集于湖南长沙, 为桃 *P. persica* 的成熟种子去皮所得, 以上样品均由黄开颜主管药师鉴定。

1.3 蛋白样品制备: 以 pH 7.4 的 TE 缓冲液 (0.1 mol/L Tris, 5 mmol/L EDTA) 为提取缓冲液, 将 0.5 g 样品先在研钵中室温粉碎, 加 10 mL 冰冷提取缓冲液到研钵中, 与研磨过的样品混匀, 然后倒入干净的玻璃匀浆器中插入冰中匀浆 10 min, 12 000 r/min 4℃离心 5 min, 取上清 0.5 mL, 加入 0.4 mL 20% 的蔗糖水溶液, 0.1 mL 溴酚蓝指示剂, 混匀后 -70℃ 冰箱保存备用。

1.4 梯度 PAGE 按文献^[7]提供的方法制备 4%~30% 的梯度聚丙烯酰胺凝胶, 250 V 预电泳 20 min,

然后每孔上样 25 μL, 250 V 恒压电泳 23 h。

1.5 染色与脱色: 用考马斯亮蓝 R-250 染色液固定染色 45 min, 脱色液脱色至背景无色为止。

1.6 成像: 梯度凝胶利用 BTS-20-M 凝胶分析系统成像。

2 结果与讨论

2.1 蛋白质的梯度电泳图谱条带清晰: 由图 1 可知梯度 PAGE 电泳图谱条带很清楚。梯度 PAGE 分离蛋白质是利用蛋白质分子的大小以及形状差异, 与蛋白质所带电荷的多少无关, 分子越大, 迁移率越小。中药材中蛋白质分子常有部分带电基团脱落或部分降解, 但对蛋白质分子的大小和形状影响有限, 不会对梯度电泳的结果产生大的影响, 因此中药材蛋白质的梯度电泳图谱具有高清晰度的特点。梯度 PAGE 分离蛋白要求的电泳时间比较长, 不能少于 2 000 V·h, 要取得好的分离效果, 一般要 3 000 V·h 以上, 即 300 V 恒压电泳 10 h 以上。

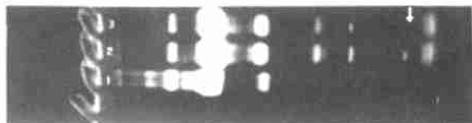


图 1 桃仁梯度 PAGE 图谱

Fig. 1 Spectra of proteins in Semen Persicae by gradient PAGE

2.2 不同来源桃仁通过梯度 PAGE 所得电泳带谱存在差别。由图 1 可知 1 号桃仁样品与 2 号、3 号桃仁样品只有 3 条带迁移率相同, 它们的带谱存在巨大差异, 因此利用梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳可以很容易地将来源于 *Prunus davidiana* 的桃仁与来源于 *P. persica* 的桃仁区分开来。2 号与 3 号桃仁都来源于 *P. persica* 只是取材地不同, 它们之间的带谱也存在细微差别 (图 1 中箭头所指)。为了排除偶然性, 我们进行了多次重复, 结果都一样。这一现象可能是由于两地相隔远, 长期的生物隔离使两地桃仁产生变异, 生成的蛋白质发生细微改变的结果。

* 收稿日期: 2002-09-23

作者简介: 张 波 (1968-), 男, 湖南安乡县人, 湖南中医学院讲师, 硕士, 主要从事中药的生物化学与分子生物学机理研究。
Tel (0731) 5381150 E-mail: zhbly 2002@ yahoo.com.cn

这一结果暗示梯度 PAGE很可能能够用来区分道地药材与非道地药材。

由此可见,梯度 PAGE以其蛋白质谱带的高清晰度与高灵敏度可以用于含蛋白中药材的鉴定,是含蛋白中药材鉴定的好方法。

References

- [1] Zhao H Y, Chen Y L. Protein electrophoresis identification of six kinds of seeds in Amaranthaceae [J]. *China Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2000, 25(1): 52.
- [2] Li F, Pan L K, Ji J Y, *et al.* Identification of *Cornu Saigae Tataricae* and its adulterant by gel electrophoresis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(5): 454-455.
- [3] Li F, Zhang Z Q, Ren Z H, *et al.* Identification of seven kinds of animal gelatin by SDS polyacrylamide gel elec-

trohoresis [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1999, 22(4): 184.

- [4] Chen Z D, Hou L B, Chen L Z, *et al.* Identification of proteins from *Panax pseudo ginseng* var. *notoginseng* and its confusable varieties by HPCE [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(11): 859.
- [5] Li S G, Zhou Q H. Analysis of malate dehydrogenase isozymes in Taihe Negro by thin-layer isoelectric focusing polyacrylamide gel electrophoresis [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1997, 22(6): 325.
- [6] Guo Q Y, Chen D X, Ren W, *et al.* Identification of penis from *Cervus nippon* Temminck and *Bos taurus domesticus* Gmelin by cellulose-acetate membrane electrophoresis [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1998, 21(12): 611.
- [7] Zhang L X. *Experimental Methods and Techniques of Biochemistry* (生物化学实验方法和技术) [M]. 2nd ed. Beijing: High Education Publishing House, 1997.

决明子与混淆品茛芒决明的比较鉴别

朱山寅¹,徐洪杰²,徐木根^{3*}

(1. 浙江省嘉兴市药品检验所,浙江 嘉兴 314001; 2. 浙江省嘉兴医药集团公司,浙江 嘉兴 314001; 3. 浙江省桐乡市第二人民医院,浙江 桐乡 314511)

决明子为常用中药,具有清热明目,润肠通便的功效,来源于豆科植物决明 *Cassia obtusifolia* L. 或小决明 *C. tora* L. 的干燥成熟种子^[1]。目前发现有将豆科植物茛芒决明 *C. sophera* L. 的干燥成熟种子充当决明子出售。为了防止混淆误用,对两者的性状、显微特征、薄层色谱及紫外吸收光谱进行了比较研究。

1 仪器与材料

1.1 仪器: UV-265WF型可见紫外分光光度计(日本岛津)。

1.2 材料:决明子 *Cassia obtusifolia* L. 为本所标本;茛芒决明 *C. sophera* L. 在接受中药真伪质量咨询时获得并经朱山寅鉴定;大黄素、大黄酚对照品购自中国药品生物制品检定所;硅胶 H 为青岛海洋化工厂生产;其它化学试剂均为分析纯。

2 药材性状

决明子:呈四棱方形或短圆柱形,两端平行倾斜,其中一端钝圆或平截,另一端具一斜尖。长 0.3~0.6 cm,宽 0.2~0.4 cm。表面棕绿色或暗棕色,有光泽,背腹面各有一条突起的棱线,两侧各有一条细带状淡黄棕色略下凹的纹理。质坚硬,不易破碎。横断面可见灰白色胚乳,期间有两 S 形桔黄色子叶。气微,味微苦。

茛芒决明:呈扁圆形,一端具喙状突起,长 0.3~0.5 cm,宽 0.3~0.4 cm,厚约 0.2 cm。表面灰棕色,有椭圆形下凹的纹理,颜色明显较周围深。横断面子叶两片,桔黄色,平直。气微,味淡。

3 显微特征

3.1 横切面:决明子:栅状细胞位于表皮下方,由一列栅状细胞组成,壁多木化增厚,光辉带位于上下部 1/3 处,内含棕色物,子叶 2,呈“S”形折曲并重叠(图 1-A)。

茛芒决明:栅状细胞位于表皮下方,由一列栅状细胞组成,光辉带在栅状细胞外缘处,内胚乳多粘液化,内含棕褐色物。子叶 2,并列(图 1-B)。

3.2 粉末:决明子:为绿褐色粉末。种皮栅状细胞多成片,无色或淡黄色,横断面观细胞 1 列,长 40~55 μm ,宽 7~11 μm ,壁较厚,胞腔明显。表面观呈多角形,壁微皱缩。种皮支持细胞 1 列,无色,侧面观哑铃状,长 14~24 μm ,表面观类圆形,直径 30~60 μm ,可见环状增厚壁。角质层碎片厚 10~20 μm ,可见多角形网格样纹理。草酸钙簇晶存在于营养层薄壁细胞中,直径 10~25 μm 。有少量草酸钙方晶,内胚乳细胞壁多粘液化,胞腔内含黄棕色物。子叶碎片可见(图 2-A)。

* 收稿日期: 2002-10-16

作者简介:朱山寅(1958-),男,浙江嘉兴市人,副主任中药师。曾从事过药理学教学工作,现任药检所中药室主任,主要从事中药的分析检验及药品质量控制的研究工作,在专业杂志上发表科研论文 36 篇,其中多篇论文获奖。 Tel: (0573)2073235