

3.1 本实验采用正交设计及统计软件对葛根芩连汤方进行分析,结果表明,在 0.05 水平下,葛根、黄连对黄芩苷的含量的影响差异具有显著性,这说明葛根、黄连在该汤中使黄芩苷含量降低。甘草对黄芩苷的含量的影响差异无显著性,黄连、葛根、甘草三者两两交互作用影响差异不显著。

3.2 黄连使黄芩苷的含量降低,有一些文献报道认为降低的原因系小檗碱与黄芩苷形成复合物所致。鉴于目前没有人真正获取复合物并确定其结构,因此是否产生了复合物还有待进一步的研究证实。实验中发现含黄连、黄芩煎液 pH 值低于黄芩单煎液。由于黄芩苷在较低 pH 值下由盐的形式转化为酸的形式导致溶解度降低,因此导致黄芩苷含量降低的原因也有可能是 pH 值的降低之故。

3.3 在本实验色谱条件下没有发现新的色谱峰。

3.4 实验中发现凡是含黄连、黄芩的配伍煎液在放

冷的过程中均产生大量的沉淀,而单煎液在同样的条件下沉淀很少。对含黄连、黄芩各配伍产生沉淀的分析表明,沉淀中所含的主要成分之一为黄芩苷(约占沉淀物的 30% ~ 40%),其原因可能是由于黄连中小檗碱主要以盐酸盐的形式存在,煎液为酸性,而黄芩中的黄芩苷也有部分以盐的形式存在,在 pH 值较低的情况下转化为黄芩苷而析出。

3.5 葛根能降低方中黄芩苷的含量,其原因可能是葛根中含有和黄芩苷结构相似的成分,与黄芩苷存在竞争溶剂的作用,其机制有待进一步的研究证实。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. 2000 ed. Vol .
- [2] Tan X M, Dai K J, Liu H H. Determination of baicalin in Gegen Qinlian Micropill by HPLC [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2001, 7(4): 4-5.
- [3] Informaion Center of Chinese Herbal Medicine, State Pharmaceutical Administration of China. *Handbook of Active Constituent in Phytomedicine* (植物药有效成分手册) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1986.

蜂毒素的 SDS-PAGE 质控方法研究

翟东霞, 刘 岭, 张亚妮, 凌昌全*

(第二军医大学附属长海医院 中医科, 上海 200433)

摘要: 目的 建立以 SDS-PAGE 进行蜂毒素质量控制的方法。方法 将通过凝胶色谱法从蜜蜂毒中分离纯化所得到的蜂毒素, 以 SDS-PAGE 法测定其相对分子质量, 并通过凝胶成像扫描测定蜂毒素纯度。结果 蜂毒素样品电泳后在凝胶块上显示为均一条带, 相对分子质量约为 2 800, 含量为(90.59 ± 0.85)%, 与 HPLC 测定结果平行。结论 SDS-PAGE 法作为蜂毒素的质控方法, 结果准确、可靠、简便。

关键词: 蜂毒素; SDS-PAGE; 银染; 凝胶扫描

中图分类号: R 286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2003)07-0600-03

Study on quality control of melittin by SDS-PAGE method

ZHAI Dong-xia, LIU Ling, ZHANG Ya-ni, LING Chang-quan

(Department of TCM, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Object** To establish a SDS-PAGE method on quality control of melittin. **Methods** Melittin was extracted and purified from bee venom by gel chromatography. Purity and molecular mass of melittin were determined by SDS-PAGE. **Results** In the gelatinous board, the sample was a single peptide-chain with a molecular mass of about 2 800 dalton as revealed by SDS-PAGE. The purity was (90.59 ± 0.85)%, which was in parallel with the result tested by HPLC. **Conclusion** SDS-PAGE is accurate, reliable and simple for the determination of melittin.

Key words: melittin; SDS-PAGE; silver-dyed; gel image scanning

蜜蜂毒是中华蜜蜂 *Apis cerana* Fabricius 或意大利蜜蜂 *A. mellifera* Linnaeus 尾部蜇刺腺内分泌

的有毒液体, 含有多种不同化学结构的活性物质。蜂毒素(melittin)是蜜蜂毒中的主要成分, 约占蜂毒含

* 收稿日期: 2002-09-26

基金项目: 军队“九五”重点课题(98JD-3269); 上海市科学技术委员会资助项目(02DE19109)

作者简介: 翟东霞(1977—), 女, 江苏扬州人, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合。Tel: (021) 25070720 E-mail: zhaidongxia@163.net

量的 40%, 系由 26 个氨基酸构成的小分子多肽, 相对分子质量约为 2 840^[1]。蜂毒素具有很高的生物活性, 现代药理研究表明蜂毒素能够抗炎、镇痛、抑制血小板凝集^[2]。本实验结合以凝胶色谱法从蜜蜂毒中分离和纯化蜂毒素的方法^[3], 建立了十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法结合硝酸银染色测定蜂毒素相对分子质量, 通过凝胶扫描检测其含量, 并将测定结果与高效液相色谱(HPLC)法的结果进行比较。

1 仪器和试剂

Electrophoresis-301 型电泳仪(瑞典 Amersham Pharmacia 公司), SX-300 扫描分析系统(上海四星生物技术实业有限公司), Sixing Bio Image 分析软件 2.0 版本(上海四星生物技术实业有限公司)。

蜂毒素样品(长海医院中医科实验室制备, 冻干品), 蜂毒素对照品(色谱纯, 纯度达 100%, 美国 Sigma 公司, 产品号: M 1407), 30% 丙烯酰胺溶液(上海华舜生物公司), 十二烷基硫酸钠(电泳纯, 美国 Sigma 公司), 三羟甲基氨基甲烷(电泳纯, 美国 Sigma 公司), TEMED(电泳纯, Sigma 公司), 过硫酸铵(电泳纯, 上海华舜生物公司), 蛋白质相对分子质量标准(瑞典 Amersham Pharmacia 公司), 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 凝胶配制

2.1.1 分离胶配制: 采用 20% 浓度的配方制胶。将水 0.69 mL, 30% 丙烯酰胺溶液 6.66 mL, 1.5 mol/L Tris (pH 8.8) 2.5 mL, 10% SDS 0.1 mL, 10% 过硫酸铵 0.05 mL, TEMED 5 μ L 混匀, 按照文献的方法^[4]制胶。

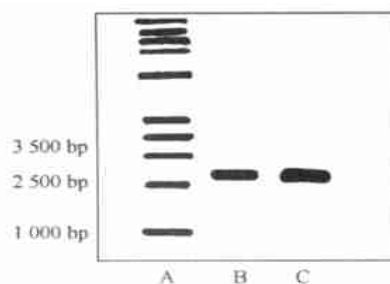
2.1.2 积层胶配制: 将水 6.35 mL, 30% 丙烯酰胺溶液 1.0 mL, 1.0 mol/L Tris (pH 6.8) 2.5 mL, 10% SDS 0.1 mL, 10% 过硫酸铵 0.05 mL, TEMED 5 μ L 混匀, 直接灌注在已聚合的分离胶上, 立即插入梳子, 静置待胶凝固后拔去梳子。置入电泳槽中。

2.2 对照品溶液的制备: 取蜂毒素对照品, 加入去离子水充分溶解, 制成 1.0 mg/mL 蜂毒素溶液, 作为对照品溶液。

2.3 样品溶液的制备: 精密称取蜂毒素样品适量于 25 mL 容量瓶中, 加入去离子水约 20 mL, 超声振荡 30 min 后, 静置至室温, 定容。用 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤, 即得样品溶液。

2.4 处理: 精密量取蜂毒素对照品溶液、样品溶液、

蛋白质相对分子质量标准(mark)各 15 μ L, 置于微量 Eppendorf 管中, 加入等体积电泳缓冲液混匀后, 放入沸水浴中 3 min, 上样。以 8 V/cm 恒定电压电泳, 至溴酚蓝前沿进入分离胶后, 提高电压到 15 V/cm, 直至溴酚蓝到达分离胶底部时停止电泳。剥下凝胶后, 参照文献方法^[4]进行银盐染色, 依次置固定液 30 min, 浸泡液 30 min, 蒸馏水漂洗 5 min 重复 3 次, 再置入银染液中 20 min, 再次漂洗后置于显色液, 室温下缓慢平摇, 直至条带清晰, 置入终止液中终止显色反应。银染结果见图 1。蜂毒素样品与对照品的条带位于相同的迁移距离, 显示为均一条带, 证实了样品与对照品的相对分子质量相同。



A-蛋白质相对分子质量标准混合物

B-蜂毒素对照品 C-蜂毒素样品

A-markers B-melittin reference substance C-melittin sample

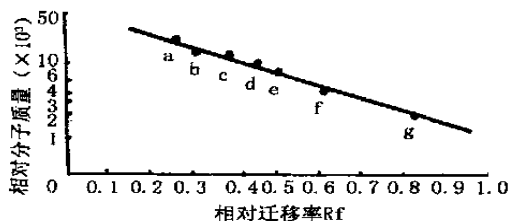
图 1 银染结果

Fig. 1 Results of slive-dyed

2.5 标准曲线绘制: 根据已知标准蛋白质相对分子质量的常用对数值及电泳条带相对迁移率 Rf, 以 Rf 为横坐标, 相对分子质量的对数值为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算得回归方程: $Y = 53\,524X - 21\,896$, $r = 0.999\,5$ 。对照品的 Rf = 0.81, 样品 Rf = 0.80, 由标准曲线读出样品的相对分子质量约为 2 800。相对迁移率(Rf) = 蛋白带迁移距离/溴酚蓝迁移距离 $\times$ 100%。标准相对分子质量曲线见图 2。

2.6 蜂毒素含量测定: 银染后的凝胶经 SX-300 扫描仪扫描后, 通过 Sixing Bio Image 分析软件计算样品中蜂毒素的纯度。取条带亮度与有效面积的乘积作为评判因子, 系统软件分析结果显示, 供试品纯度为 90.73%。称取 3 批样品, 分别置 20 mL 容量瓶中定容, 依照前述电泳条件, 测定样品中蜂毒素的含量, 每批样品检测 3 次, 结果见表 1。

2.7 与 HPLC 结果的比较: 将同样 3 批样品以 HPLC 法^[3]进行检测, 测得百分含量为 $(96.14 \pm 0.52)\%$ 。改变样品浓度, 同等条件下重复实验, 依次采用 HPLC 法检测, 发现以 SDS-PAGE 法检测出纯度较高的样品在 HPLC 上纯度也高, 半定量扫描



a-卵清蛋白(45 000) b-碳酸酐酶(30 000) c-胰蛋白酶抑制剂
(20 100) d-溶菌酶(14 300) e-抑肽酶(6 500) f-胰岛素 B
链(3 500) g-胰岛素 A 链(2 500)
a-ovalbumin (45 000) b-carbonic anhydrase (30 000)
c-pancrezyme inhibitor (20 100) d-lysozym (14 300)
e-aprotinin (6 500) f-insulin B (3 500) g-insulin A (2 500)

图 2 标准相对分子质量曲线

Fig. 2 Curve of standard molecular weight

浓度高的样品在 HPLC 上吸收峰面积也大, 3 批样品测得含量依次为 96.09%, 97.11%, 94.22%, *RSD* 分别为 0.44%, 0.50%, 0.69% ($n = 3$)。与 SDS-PAGE 结果呈大致平行关系。

表 1 3 批蜂毒素样品含量测定结果($n = 9$)

Table 1 Determination results of melittin in three groups ($n = 9$)

批号	样品/ mg	纯度/ %	<i>RSD</i> / %
20020209	12.00	90.58	1.01
20020314	11.00	91.45	1.06
20020521	10.10	89.75	1.17

3 讨论

由于蛋白质的迁移率与相对分子质量成相关关系, 因而可以用 SDS-PAGE 法测定蛋白质的相对分子质量。对于相对分子质量小于 15 KD 的小分子多肽, 浓度越高的聚丙烯酰胺凝胶电泳其分辨率越高^[5]。蜂毒素系小分子多肽, 本实验采用了 20% 浓度的凝胶, 使各组分获得良好分离, 避免某些蛋白质迁移不规则而导致的相对分子质量测定误差; 银染法对于单一蛋白质条带, 能检出的蛋白质最低量为

2 ng, 其灵敏度较考马斯亮蓝法约提高了 100 倍^[6], 适于检测样品蛋白的单一性。故高浓度的 SDS-PAGE 结合银染法, 对分离小分子多肽, 具有高度准确性和分辨能力。

在蛋白质类物质的分离纯化和纯度检测中, 单以一种方法进行, 往往难以得到准确结果, 习惯上采用两种以上的方法^[6]。SDS-PAGE 扫描所测得的含量略低于 HPLC 结果, 主要是由于电泳条带略有弥散, 在截取有效面积时有所损失, 导致结果偏低。将 SDS-PAGE 与半定量分析系统配合使用, 可以在获取样品相对分子质量信息的同时较准确地测定样品含量, 其检测结果与 HPLC 接近, 且两者的检测结果之间具有平行关系。因此, 本研究在已有蜂毒素 HPLC 质控方法的基础上, 建立了 SDS-PAGE 法用于蜂毒素的定性定量分析。

与 HPLC 法比较, SDS-PAGE 虽然检测结果的准确性及灵敏度略低, 但一次电泳可同时完成 10 个样品的上样检测, 效率高且操作简便, 实验成本低廉, 因此, 就蜂毒素等小分子及其相关产品的质控而言, 采用 SDS-PAGE 法是基本可行的。

References:

[1] Barbara ECB. New methods of isolation bee venom peptide [J]. *Anal Biochem*, 1981, 116: 48-52.
[2] Habermann E. Bee and wasp venom [J]. *Science*, 1972, 177: 314-322.
[3] Liu L, Ling C Q, Hu J H, *et al.* Isolation, purification and determination of melittin from bee venom [J]. *Acad J Second Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2001, 22(7): 609-611.
[4] Ausubel F, Brent R, Kingston R, *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology* (精编分子生物学实验指南) [M]. Beijing: Science Press, 1998.
[5] Guo R J. *Technique of Electrophoresis* (蛋白质电泳实验技术) [M]. Beijing: Science Press, 1999.
[6] Xia Q C. *Technique and Development of Protein Chemistry* (蛋白质化学研究技术与进展) [M]. Beijing: Science Press, 1999.

(上接第 597 页)

号, 结合¹HNMR, 初步认为符合贝壳杉烷型四环二萜类化合物的谱学特征^[4]。δ6.7, 1.70.6 提示为连有羟基的伯碳和叔碳信号, 分别确定为 C-17 位和 C-18 位信号。¹HNMR (C₅D₅N) 谱给出 δ4.43(1H, d, $J = 10.8$ Hz, H₁₈-Ha), 4.40(1H, d, $J = 10.8$ Hz, H₁₈-Hb), 4.02(1H, d, $J = 10.8$ Hz, H₁₇-Ha), 3.99(1H, d, $J = 10.8$ Hz, H₁₇-Hb), 3.66(1H, s, H-16) 和 1.12(3H, s, C₂₀-CH₃) 等信号。该化合物与文献^[3]对照基本一致, 故鉴定该化合物为对映-16αH, 17, 18-

二羟基-贝壳杉烷-19-羧酸。

References:

[1] Wu W, Gao H, Wang L J, *et al.* Advances in research of *Siegesbackia pubescens* [J]. *Spec Wild Econ Anim and Plant Pes* (特产研究), 1999, 22(4): 46-48.
[2] Gao H, Li Y, Li D K, *et al.* Studies on chemical constituents from *Siegesbackia pubescens* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(6): 495-496.
[3] Xiong J, Ma Y B, Xu Y L. Diterpenoids from *Siegesbackia pubescens* [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(3): 917-918.
[4] Gao H, Li P Y, Li D K. The study and application of kauran tetranuclear diterpene compounds by ¹³CNMR [J]. *Chin J Magn Resonance* (波谱学杂志), 2000, 17(4): 335-342.