

552.57X - 0.199,  $r = 0.9999$ , 线性范围为 0.06~2.02  $\mu\text{g}$ 。

2.4 精密度试验: 精密吸取上述对照品溶液 2  $\mu\text{L}$ , 连续进样 5 次, 以峰面积计算,  $RSD = 0.92\%$ , 表明分析结果的精密度良好。

2.5 重现性试验: 取同批次狭基线纹香茶菜药材样品 5 份, 按 2.2 项下方法制备供试液, 进样 5  $\mu\text{L}$ , 测得 2 $\alpha$ -羟基熊果酸的平均含量为 0.9154  $\text{mg/g}$ ,  $RSD = 0.56\%$ , 重现性符合要求。

2.6 稳定性试验: 精密吸取同一批次样品溶液 5  $\mu\text{L}$ , 分别于样品溶液配制后 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h 进行测定, 以峰面积计算,  $RSD = 1.17\%$ , 表明样品溶液放置 48 h 稳定。

2.7 回收率试验: 精密称取 5 份已知 2 $\alpha$ -羟基熊果酸含量的狭基线纹香茶菜 0.25 g, 分别准确加入 2 $\alpha$ -羟基熊果酸对照品 0.5  $\text{mg}$ , 按 2.2 项下方法制备供试液, 进样 5  $\mu\text{L}$ , 测定峰面积, 结果平均加样回收率为 99.3%,  $RSD = 2.71\%$ 。

2.8 样品测定: 取广东清远 GAP 基地不同批次 (以采收日期编号) 狭基线纹香茶菜 0.5 g, 按 2.2 项下方法制备供试液, 进样 10  $\mu\text{L}$ , 进行测定, 按外标法以峰面积积分值计算 2 $\alpha$ -羟基熊果酸的含量, 实验结果见表 1。

### 3 讨论

3.1 首次建立了采用 RP-HPLC 法测定狭基线纹香茶菜中 2 $\alpha$ -羟基熊果酸含量的测定方法。比较了不同溶剂系统和比例的流动相, 如甲醇-水, 乙腈-甲醇-水, 乙腈-0.1% 盐酸溶液, 乙腈-0.05% 三氟乙酸溶液, 结果表明: 在波长 210 nm, 流速 0.8  $\text{mL/min}$ , 柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ , 乙腈-0.05% 三氟乙酸溶液 (70:5:29.5) 为流动相的条件下, 可以对狭基线纹香茶菜中

表 1 广东清远 GAP 基地狭基线纹香茶菜中 2 $\alpha$ -羟基熊果酸的含量 (n = 3)

Table 1 Contents of 2 $\alpha$ -hydroxy-ursolic acid in *Rhopanthoides var. gerardianus* in GAP base in Qingyuan of Guangdong Province (n = 3)

批号	采收日期	2 $\alpha$ -羟基熊果酸含量/%	RSD/%
1	07-25	0.2351	1.34
2	08-17	1.9342	0.93
3	08-25	1.3724	2.12
4	09-01	0.6172	1.16
5	10-08	0.5479	0.78

2 $\alpha$ -羟基熊果酸定量测定, 且简便、快速、无干扰, 重现性好, 结果准确。

3.2 本实验以狭基线纹香茶菜中 2 $\alpha$ -羟基熊果酸的含量为指标, 筛选并确定了用甲醇 30 min 重复加热回流提取两次的最佳提取方法。

3.3 不同采收期 GAP 基地狭基线纹香茶菜样品, 其 2 $\alpha$ -羟基熊果酸成分以 8 月份含量为高, 8 月中旬含量最高, 即开花前枝叶繁盛期为狭基线纹香茶菜的最佳采收期。并提示 2 $\alpha$ -羟基熊果酸可能在叶中的含量较高, 有关研究另见报道。

### References

- [1] Jiangsu New Medical College *Dictionary of Chinese Materia Medica* (中药大辞典) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1997.
- [2] Jin R L, Cheng P Y, Xu G Y, et al. A Study on the compositions of rhabdoserrin B [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1987, 13 (10): 39.
- [3] Jin R L, Cheng P Y, Xu G Y, et al. A study on the compositions of rhabdoserrin A [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1985, 20(5): 366.
- [4] Hunan Public Health Bureau *The Standard of Chinese Medicinal Materials Herbs in Hunan* (湖南省中药材标准) [M]. Changsha: Hunan Science and Technology Press, 1993.
- [5] Chen J N, Lai X P, Liu N. The investigation of original flora of *L. linearis* *Rabdosia* *H. herbs* and the determination of commodities of Guangdong [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1996, 19(2): 73-74.

## 甘草的免疫学鉴定方法研究

白 钢<sup>1</sup>, 曹学琳<sup>1</sup>, 杨文博<sup>1</sup>, 唐元泰<sup>2</sup>, 芮 菁<sup>2</sup>, 梁会旭<sup>2\*</sup>

(1. 南开大学生命科学学院, 天津 300071; 2. 天津市药品检验所, 天津 300070)

**摘要:** 目的 利用种属特异性蛋白建立一种生药甘草的免疫学鉴定方法。方法 选用生药甘草为实验对象, 利用抗甘草总抗原血清并结合 Western-blot 的结果确定甘草种属特异性蛋白 (RGP)。分离纯化该蛋白抗原并制备和生物素标记其特异性抗体, 建立夹心式 ELISA 法用于甘草的分析鉴定。结果 该方法灵敏度高、专属性强, 对不同产

\* 收稿日期: 2003-04-11

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目 (003805311)

作者简介: 白 钢 (1967—), 男, 药理学博士, 南开大学生命科学学院教授, 博士生导师, 主要从事现代生物技术与中药现代化的研究。  
E-mail: gangbai@eyou.com

地及品种的甘草显示了良好的特异性,可以用于生药的鉴定和分析。结论 以甘草自身的特异性蛋白为指标的免疫学分析方法,将为生药甘草的品种鉴定及中药材的质量管理提供一条新的途径。

关键词: 特异性蛋白; 甘草; ELISA

中图分类号: R282.710.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)01-0083-04

### Study on immunoassay method for *Radix Glycyrrhizae* identification

BA I Gang<sup>1</sup>, CAO Xue-lin<sup>1</sup>, YANG Wen-bo<sup>1</sup>, TANG Yuan-tai<sup>2</sup>, RU I Jing<sup>2</sup>, LIANG Hui-xu<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China)

**Abstract: Object** To develop an immunoassay method of species-specific protein for *Radix Glycyrrhizae* (RG) identification. **Methods** The crude drug of RG as a model was studied in this paper, the antigen of RG protein (RGP) was screened by Western-blot analysis using anti-RG serum. After species-specific protein, RGP was purified, and rabbit antiserum against RGP was prepared, the rabbit IgG of anti-RGP was isolated and biotinylated, then the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed. **Results** The method was only specific to RG, which was harvested from various areas or species, and showed excellent sensitivity and reproducibility. **Conclusion** The result suggests that the immunoassay method using specific antigen of RGP as a detection objective be a new potential for the unequivocal identification and quality control of RG.

**Key words:** specific protein; *Radix Glycyrrhizae* (RG); ELISA

生物物种的多样性基于基因的多态性,而基因的多态性可以体现在形态、组织、染色体、分子和化学成分等不同的水平上。分子生物学技术的发展使中药的鉴定从传统的形态表征、理化性质的判别扩展到对生药生物信息大分子,如DNA、RNA和蛋白质等生命信息载体的研究。作为三级信息物质,蛋白质能更好地反映了种属之间的关系,是可靠的分类学指标,同种生药也往往含有结构相同或相似的蛋白质组以区别于其他种属的药材,但长期以来在中药的鉴定中却一直被忽视。本题选用生药甘草为例,筛选和分离其种属特异性蛋白抗原,建立快速、灵敏、特异的免疫学鉴定方法,从蛋白质水平上进行中药材鉴别,为生药品种鉴定提供一种新的可能性。

#### 1 材料和方法

1.1 材料:内蒙、赤峰和东北3种不同产地的乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 以及黄果甘草 *G. korshinskyi* G. Grig. 光果甘草 *G. glabra* L.、胀果甘草 *G. inflata* Batal, 分别由天津市药品检验所提供,其他生药(桃仁、三七、人参、苦参、泽泻、天花粉、没药)购于中国药品生物制品检定所。

1.2 试剂: 弗氏佐剂(G<sub>60</sub>BRL); 活化生物素(sulfo-NHS-LC-Biotin EZ-Link™, PIERCE); 硝酸纤维素膜(MILLIPORE); 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG, 辣根过氧化物酶标记亲合素, 邻苯二胺(OPD), 3,3'-二氨基联苯胺(DAB), 牛血清白蛋白(BSA)购于华美生物工程公司(国产), 其他试剂

均为分析纯。

1.3 主要仪器: 酶标仪(Bio-tech, ELX800), 冷冻干燥机(Christ, ALPHA1—4), 高速冷冻离心机(Beckman, 20RP52D), 电泳及电转移系统(国产), 超声波细胞粉碎仪(国产)。

1.4 抗生素总抗原血清的制备: 取生药甘草的干燥粉末50mg于5mL PBS中, 超声波提取。取上述提取液1mL与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化后, 对家兔皮下进行多点注射。每隔两周加强注射一次, 定期测定抗血清效价, 待获得最高效价后, 收集血清, 灭活, -20℃保存备用。

1.5 Western-blot: 生药超声波提取液样品经SDS-PAGE电泳分离后, 将分离胶迅速电转移至硝酸纤维素膜上。封闭后, 加入1000倍稀释的上述抗总抗原血清10mL, 室温反应3h。以PBST充分冲洗后, 加入1000倍稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体溶液10mL, 室温继续反应1h, 充分洗涤, 加入DAB底物显色。

1.6 特异性抗体的制备及标记: 以精制的甘草特异性蛋白(RGP)为抗原免疫家兔制备抗血清。取上述血清经硫酸盐析, 透析, 对DEAE-cellulose 52离子交换柱进行离子交换层析精制 IgG 抗体。取精制 IgG 抗体30mg, 溶于0.1mol/L NaHCO<sub>3</sub>(pH 8.5)溶液2mL中, 加入活化生物素3mg, 搅拌, 室温反应2h, 加入甘氨酸60mg终止反应。生物素标记抗体经50%饱和硫酸沉淀2次后, 沉淀物以2mL

PBS 溶解, 透析后, - 20 保存备用。

1.7 夹心式 ELISA 方法的建立: 取 10 μg/mL Anti-RGP 抗体 100 μL 于酶标板的各孔中, 37 , 放置 3 h, 包被酶标板。经 1% BSA 封闭后, 分别加入系列稀释的 RGP (或样品) 100 μL, 37 , 放置 1 h 后, PBST 充分冲洗后, 分别加入 500 倍稀释的生物素化 Anti-RGP 抗体 100 μL, 37 , 放置 1 h。PBST 充分冲洗, 加入稀释 1 000 倍亲合素化辣根过氧化物酶 100 μL, 反应 30 min, PBST 充分冲洗后, 再加入 OPD 底物显色 4 min, 以 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 并于 490 nm 处测其吸光度。

2 结果与分析

2.1 特异性抗原成分的鉴定: 分别将 RG-1 (内蒙)、RG-2 (赤峰) 和 RG-3 (东北) 3 种不同产地的乌拉尔甘草及其他 7 种生药抗原样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western-blot 分析 (图 1)。CBB 染色表明不同生药中存在多种不同蛋白成分, 而 3 种甘草样品在 32 和 28 kDa 处均呈现了两条相同的主要蛋白带。Western-blot 的结果也表明, Anti-RG 血清与甘草的蛋白抗原均显良好的反应性, 同其他生药不发生交叉反应。证明甘草具有特异性的种属蛋白, 利用该蛋白可以进行甘草的免疫学鉴定。

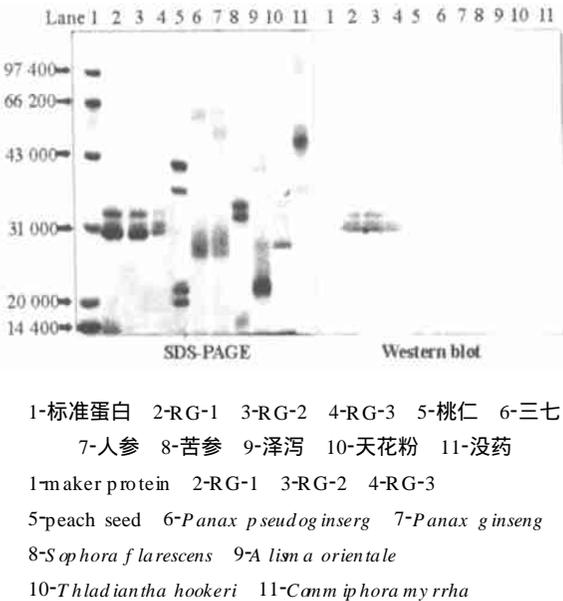


图 1 9 种生药的免疫印迹分析

Fig 1 Western blot analysis of nine crude drugs

2.2 抗原成分的分选: 甘草粉末 2 g, 经 40 mL 蒸馏水, 4 , 3 次提取后, 合并提取液经 70% 硫酸盐析, 离心, 沉淀用少量 PBS 溶解, 透析, 得粗提物。上述粗提物经 Sephadex G-75, DEAE-cellulose 52, Sephadex G-150 分离, 分别以 Lowry 法检测蛋白含量, 以 ELISA 法测定抗原活性, RGP 的纯化倍数为

128 倍 (表 1)。电泳分析表明 RGP 的相对分子质量为 59 kDa, 由 32 和 28 kDa 亚单位组成 (图 2)。

2.3 样品分析: 以未标记的 Anti-RGP 抗体作固相抗体结合 RGP 抗原, 以生物素化 Anti-RGP 抗体结合酶标亲合素检测其变化。结果如图 3 所示, RGP 的浓度在 2~ 20 ng/mL 范围内与结合的 HRP 酶活性呈现良好的线性关系 ( $Y = 0.024 5X + 0.017 4$ ,  $r = 0.999$ ),  $RSD < 5.0\%$  ( $n = 6$ )。不同品种与产地的甘草超声波提取液中 RGP 含量分别为 17.8~ 82.7 μg/

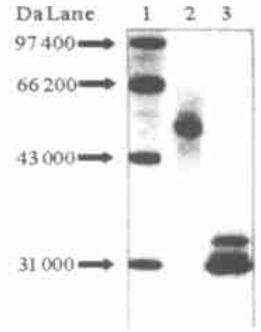


图 2 甘草特异性蛋白的电泳分析

Fig 2 SDS-PAGE and native PAGE analysis of RGP

mL, 而除甘草外的桃仁、三七、人参、苦参、泽泻、天花粉、没药等多种生药均未呈现交叉反应, 证明该方法具有良好的灵敏度和专属性 (表 2)。

表 1 特征抗原的纯化结果

纯化步骤	蛋白含量/mg	抗原活性/(IU · mL <sup>-1</sup> )	纯化倍数
Extract	360	2.52	1.0
Salt out	72.8	2.85	1.14
Sephadex G-75	8.71	19.1	7.65
DEAE-cellulose	6.51	186	74.5
Sephadex G-150	5.02	320	128

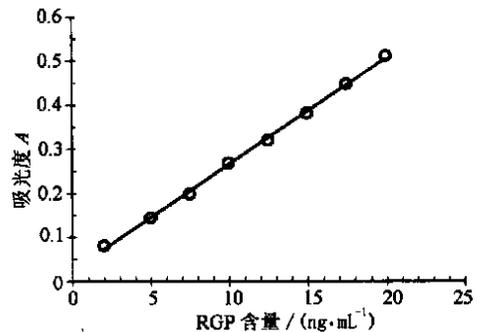


图 3 RGP 的标准定量曲线

Fig 3 Typical dose response curves of RGP

3 讨论

以往植物药材的鉴定及品质分析主要采用形态学特征识别和小分子代谢产物的理化分析、色谱光谱分析来进行药物评价<sup>[1]</sup>。近几年, 在《中华人民共和国药典》中收录了中药材的 SDS-PAGE 电泳鉴定方法并有相关报道<sup>[2]</sup>, 同时引入 RFLP, RAPD 等分

子生物学检测技术<sup>[3,4]</sup>,但由于条件的限制和缺乏规范化操作标准,上述方法尚未能得到广泛应用。

表 2 不同生药的提取物中 RGP 含量的测定

Table 2 Contents of RGP in extracts from different crude drugs

甘草样品	含量/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	对照药材	含量/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
GR1 <i>G. uralensis</i>	79.0	桃仁	未检出
GR2 <i>G. uralensis</i>	82.7	三七	未检出
GR3 <i>G. uralensis</i>	30.4	人参	未检出
GR4 <i>G. korshinskyi</i>	17.8	苦参	未检出
GR5 <i>G. glabra</i>	25.0	泽泻	未检出
GR6 <i>G. inflata</i>	20.4	天花粉	未检出
		没药	未检出

虽然国内一些动物来源的药材的血清学研究已有开展<sup>[5,6]</sup>,但占中药资源 87% 的植物来源的生药材却很少通过免疫学方法进行研究。本实验及相关研究以生药甘草为例<sup>[7-9]</sup>,提出利用生药自身的特异性蛋白质(组),建立免疫学方法可以用于中药材的分析,为中药鉴定、质量标准研究提供一个新思路。与电泳法和核酸分析相比,免疫学检测方法具有灵敏度高、专属性强、简便快速、检测成本低、利于在基层单位普及的特点。但由于特异性蛋白的稳定性的原因,药材的炮制以及中成药的加工也将对该方法的适用范围产生一定的影响,还有待于进一步研究。

## References

- [1] Jiang R W, Lu Y. The modern progress in methods of identifying traditional Chinese medicine [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 1998, 23(12): 757-759.
- [2] Chen Z J, Chen K, Wang X, et al. Studies on gel electrophoresis atlas of soluble protein in *Bungarus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(5): 374-377.
- [3] Yang G M, Cai B C, Wang M Y, et al. Application of molecular biological technology in identification of traditional Chinese medicine [J]. *World Sci Tech* (世界科学技术), 2001, 3(4): 29-34.
- [4] Ren B R, He S A, Yu H, et al. Evaluating the relationships between populations of swordlike atractylodes (*Atractylodes lance*) by random amplified polymorphic DNA technology [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(6): 458-461.
- [5] Guo Y Q, Chen D X, Liu F, et al. Identification of deer heart and its counterfeiting products by immuno-agglutination testing [J]. *J Chin Med Pharmacol* (中医药学报), 2000, 28(1): 62-63.
- [6] Guo Y Q, Chen D X, Li H. Identification of deer testes and penis and its counterfeiting products by immuno-agglutination testing [J]. *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2000, 14(2): 103-106.
- [7] Kitagawa T, Bai G, Fujiwara K. Specificities of five kinds of antisera produced against crude drugs, *Pinellia tuber*, *Hoelen*, *Glycyrrhizae radix*, *Trichosanthes root* and *Panax ginseng* [J]. *Biol Pharm Bull*, 1996, 19(3): 335-340.
- [8] Bai G, Fujiwara K, Tanimori H, et al. Development and application of a sandwich enzyme immunoassay for *Radix Glycyrrhizae* protein (RGP) using monoclonal antibodies [J]. *Biol Pharm Bull*, 1977, 20(12): 1224-1228.
- [9] Bai G, Yang W B, Cao X L, et al. Using immunological method for detection and quantitative measurement of the contents of *Radix Glycyrrhizae* component composing traditional Chinese medicines [J]. *Acta Sci Nat Univ Nankai* (南开大学学报·自然科学版), 2002, 35(3): 87-90.

## 灯台树种子萌发特性的研究

蔡传涛, 兰芹英, 刘宏茂, 姚天全, 刀祥生\*

(中国科学院西双版纳热带植物园昆明分部, 云南 昆明 650223)

**摘要:**目的 研究灯台树种子萌发的最适宜条件和储藏时间,为大量人工繁殖灯台树苗提供借鉴。方法 不同温度、不同光照时间、不同光质及不同储藏时间,测量灯台树种子的萌发率。结果 灯台树种子萌发的适宜温度为 30 ~ 40 °C,适宜的光照时间为 8 h,适宜的光质为黄光和日光,储藏时间为 5 个月以内最好。结论 灯台树种子是高温萌发型。

**关键词:** 灯台树种子; 萌发特性; 萌发率

中图分类号: R 282.21

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)01-0086-03

### Germ ination characters of seed of *Alistonia scholaris*

CAI Chuan-tao, LAN Qin-ying, LIU Hong-mao, YAO Tian-quan, DAO Xiang-sheng

(Kunming Division of Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Science, Kunming 650223, China)

**Key words:** the seed of *Alistonia scholaris* (L.) B. Br.; germination characters; sprout rate

收稿日期: 2003-04-09

基金项目: 云南省省院省校科技合作项目(200YKS01); 中国科学院“西部之光”项目

作者简介: 蔡传涛(1964—),男,湖北人,副研究员,硕士,主要研究方向为民族传统文化、资源植物开发与利用、植物生态与区域持续发展等,发表论文 23 余篇,出版专著 2 部,申请国家发明专利 8 项。

Tel: (0871) 5161114 E-mail: caict@xtbg.ac.cn or caictao@public.km.yn.cn