

## 黄芪蛋白提取方法的比较

刘杨<sup>1</sup>, 包华音<sup>1</sup>, 刘德丽<sup>1</sup>, 单成钢<sup>2\*</sup>

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东省农业科学院农产品所药用植物研究中心, 济南 250100)

**[摘要]** **目的:**应用蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)技术筛选建立黄芪蛋白质指纹图谱及蛋白提取方法。**方法:**采用8种提取方法(稀释4倍的浓缩胶缓冲液,双蒸水,Tris-HCl法,柠檬酸盐法,PVP buffer,改良饱和酚法,TCA-丙酮法,植物蛋白提取试剂盒)提取黄芪药材的水溶性蛋白质,根据PAGE谱带的多少和清晰度优选建立黄芪药材蛋白质指纹图谱的蛋白提取条件。**结果:**植物蛋白质提取液、稀释4倍的浓缩胶缓冲液和Tris-HCl缓冲液提取的蛋白含量较高,但杂质较多,条带拖尾,部分特征峰不能得到有效分离。TCA-丙酮法、改良饱和酚法、柠檬酸盐缓冲液和PVP buffer提取的蛋白含量较低,谱带数目较少,辨识度低。以双蒸水为提取溶剂时可辨识谱带数目最多,清晰度较好,电泳指纹图谱中各峰的分离度较高。**结论:**双蒸水直接提取法更适用于建立黄芪药材的蛋白质指纹图谱。

**[关键词]** 黄芪; 生物指纹图谱; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 蛋白提取方法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0076-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200076

**Protein Extraction Methods of Astragali Radix** LIU Yang<sup>1</sup>, BAO Hua-yin<sup>1</sup>, LIU De-li<sup>1</sup>, SHAN Cheng-gang<sup>2\*</sup>  
(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China; 2. Research Centre of Medicinal Plant, Institute of Farm Products Processing, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100, China)

**[Abstract]** **Objective:** To select the protein extraction protocols for establishing biological fingerprint of Astragali Radix by using PAGE technology. **Method:** The water soluble protein of Astragali Radix was extracted by 8 different methods (concentrated gel buffer diluted by 4 times, distilled water, Tris-HCl method, the citrate method, PVP buffer, the modified saturated phenol method, TCA-acetone method and protein extract solution) and the PAGE experiment was conducted. The optimal protein extraction protocols for establishing biological fingerprint of Astragali Radix were selected according to the number and the definition of the protein bands. **Result:** The content of protein extracted by protein extract solution, concentrated gel buffer diluted by 4 times and Tris-HCl buffer was higher, but it showed a higher content of impurities, and some characteristic peaks cannot effectively isolated; the content of bands of protein extracted by TCA-acetone method, the modified saturated phenol method, PVP buffer and citrate buffer were lower, with a smaller number of bands and lower definition; bands of protein extracted by distilled water were most numerous and stabler, with a higher separation among peaks in electrophoresis fingerprint. **Conclusion:** The protein solution extracted with distilled water is more suitable for establishing the protein fingerprint of Astragali Radix.

**[Key words]** Astragali Radix; biological fingerprint; polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE); protein extraction methods

黄芪具有补气升阳,固表止汗,利水消肿,生津养血,行滞通痹,托毒排脓,敛疮生肌的功效<sup>[1]</sup>,临床应用广泛。目前野生黄芪资源几近枯竭,市场上

流通的商品黄芪多为人工栽培品<sup>[2]</sup>。由于盲目引种、种源混杂等原因,黄芪药材质量良莠不齐,严重影响其临床疗效<sup>[3]</sup>。因此,有必要开展黄芪药材生

**[收稿日期]** 20150306(008)

**[基金项目]** 山东省农业良种工程项目(2011LZ01-03)

**[第一作者]** 刘杨,实验师,从事中药质量控制与资源研究,Tel:18678869267,E-mail:yangliu0925@163.com

**[通讯作者]** \*单成钢,博士,研究员,从事药用植物遗传改良与规范化种植研究,Tel:0531-83179565,E-mail:shanchenggang@126.com

物指纹图谱相关研究,从而保证黄芪药材的来源准确和质量稳定。

蛋白质具有特异性和稳定性,是中药材鉴别研究中的重要生化标记<sup>[4]</sup>。聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)技术从蛋白水平对中药材质量进行控制,具有重复性好、灵敏度高、样品用量少等优点,可用于物种鉴定,是鉴别和研究中药材质量行之有效的方法<sup>[5]</sup>。目前,尚无通过 PAGE 技术建立黄芪药材蛋白指纹图谱的研究报道。本研究应用 PAGE 技术对多种蛋白提取方法进行比较,以期筛选出适用于建立黄芪药材蛋白指纹图谱的蛋白质提取条件,为进一步建立黄芪药材的蛋白指纹图谱和控制药材的质量提供试验依据。

## 1 材料

FA1104 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司),PB-10 型 pH 计(北京赛多利斯科学仪器有限公司),3K15 型高速冷冻离心机(德国 sigma 公司),KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),DYCZ-28D 型垂直平板电泳槽,DYY-8C 型电泳仪(北京市六一仪器厂),BioSens SC Series-805 型凝胶成像系统(上海山富科学仪器有限公司)。

药材采自山东省济南市章丘龙山基地,经山东中医药大学李峰教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var *mongholicus*,将药材磨成细粉,过四号筛。

丙烯酰胺、双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷(Tris)和聚乙烯吡咯烷酮、甘氨酸为生化试剂(BR)等试剂均为分析纯,水为双蒸水。植物蛋白提取试剂盒(批号 CW0885B,北京康为世纪生物科技有限公司),蛋白质 Marker(批号 GP2101-100  $\mu\text{L}$ , Genview)。

## 2 方法与结果

**2.1 提取液的配置** 浓缩胶缓冲液(pH 6.7),分离胶缓冲液(pH 8.9),电极缓冲液(pH 8.3),均按 PAGE 凝胶制备常规方法新鲜配制。Tris-HCl 缓冲液(pH 6.8)<sup>[6]</sup>,柠檬酸盐缓冲液<sup>[6]</sup>,PVP buffer<sup>[7]</sup>,乙酸铵/甲醇溶液<sup>[7]</sup>,Lysis buffer<sup>[7]</sup>,丙酮溶液<sup>[7]</sup>按相关文献配制。

### 2.2 样品溶液的制备

**2.2.1 直接提取** 精密称取黄芪药材粉末 6 份,各 0.5 g,于 10 mL 离心管中,分别加入稀释 4 倍的浓缩胶缓冲液,双蒸水,Tris-HCl 缓冲液,柠檬酸盐缓冲液,PVP buffer 和植物蛋白提取液 5 mL,匀浆。冰浴超声提取 25 min。12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  冷冻离心

10 min,取上清液加入等体积 40% 蔗糖溶液,混匀,4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

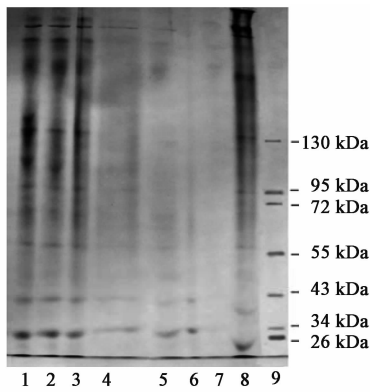
**2.2.2 改良饱和酚法** 称取药材粉末 0.5 g 于 10 mL 离心管中,加入预冷丙酮溶液 5 mL,充分震荡,12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  冷冻离心 5 min。沉淀依次用 0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸铵/80% 甲醇溶液、80% 丙酮溶液洗涤。用预冷 Lysis buffer 重悬沉淀 2.5 mL,加入 Tris-饱和酚 2.5 mL 充分混匀,12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  冷冻离心 10 min,收集上层酚相。向酚相中加入 5 倍体积的 0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  乙酸铵/甲醇溶液,-20  $^{\circ}\text{C}$  沉淀过夜,12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  冷冻离心 5 min,沉淀分别用甲醇、80% 丙酮重复洗涤 2 次并干燥。将沉淀溶解于 2.5 mL 植物蛋白提取液中,加入等体积 40% 蔗糖溶液,混匀,4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**2.2.3 TCA-丙酮法** 称取药材粉末 0.5 g 于 10 mL 离心管中,加入预冷丙酮溶液,匀浆,-20  $^{\circ}\text{C}$  静置 2 h,12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  冷冻离心 20 min,沉淀用丙酮溶液重复洗涤 2 次。向沉淀中加入蛋白质提取液 2.5 mL,超声 30 min 至沉淀完全溶解,12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  冷冻离心 10 min,取上清液加入等体积 40% 蔗糖溶液,混匀,4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**2.3 凝胶制备与电泳**<sup>[8]</sup> 分离胶按分离胶缓冲液-分离胶贮存液-0.56% 过硫酸铵-水(1:2:1:4)的比例配制;浓缩胶按浓缩胶缓冲液-浓缩胶贮存液-0.56% 过硫酸铵-40% 蔗糖溶液(1:2:1:4)的比例配制。采用垂直平板电泳,每条泳道上样量均为 20  $\mu\text{L}$ 。电泳条件为恒流,浓缩胶区恒定电流为 15 mA,分离胶区恒定电流为 25 mA,待溴酚蓝指示剂距胶板下缘 1~2 cm 时停止电泳。凝胶于考马斯亮蓝 R250 染色液中避光染色 1 h,后用脱色液脱色至胶板条带清晰,背景基本无色。

**2.4 凝胶成像分析** 采用 BioSens SC Series-805 全自动凝胶成像系统对凝胶进行拍照,并利用 BioSens 采集分析软件进行蛋白电泳图谱分析。结果见图 1,2。

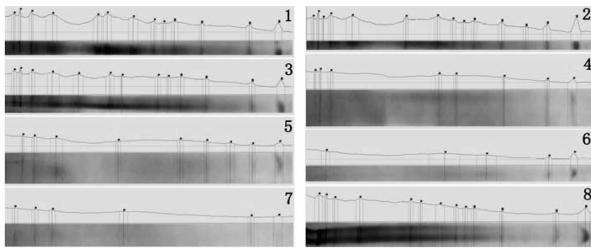
从图 1,2 可见,柠檬酸盐缓冲液、PVP buffer、改良饱和酚法、TCA-丙酮法(4,5,6,7 号)泳道背景较清晰,但条带数目较少且辨识率低,表明这 4 种方法提取的蛋白纯度相对较高,但缺点是提取的蛋白种类不全,且含量较低,因此在进行黄芪药材蛋白质指纹图谱研究时不宜采用。稀释 4 倍的浓缩胶缓冲液、双蒸水、Tris-HCl 缓冲液、植物蛋白提取试剂盒(1,2,3,8 号)提取的蛋白质 PAGE 电泳谱带数量较多,1,3,8 号均为 13 条谱带,2 号为 14 条谱带。其



1. 稀释 4 倍的浓缩胶缓冲液; 2. 双蒸水; 3. Tris-HCl 缓冲液; 4. 柠檬酸盐缓冲液; 5. PVP buffer; 6. 改良饱和酚法; 7. TCA-丙酮法; 8. 植物蛋白提取试剂盒; 9. Marker

图 1 不同溶剂蛋白质提取液的 PAGE

Fig. 1 PAGE chromatogram of protein extract from different solvent



1. 稀释 4 倍的浓缩胶缓冲液; 2. 双蒸水; 3. Tris-HCl 缓冲液; 4. 柠檬酸盐缓冲液; 5. PVP buffer; 6. 改良饱和酚法; 7. TCA-丙酮法; 8. 植物蛋白提取试剂盒; 9. Marker

图 2 黄芪蛋白不同提取方法 PAGE 指纹谱

Fig. 2 PAGE chromatogram of protein extract different method

中,植物蛋白提取试剂盒(8号)泳道染色最深,表明该方法提取的蛋白含量最高,但蛋白谱带清晰度较差,指纹图谱中部分特征峰不能得到有效的分离;稀释 4 倍的浓缩胶缓冲液(1号)和 Tris-HCl 缓冲液(3号)泳道杂质较多,条带拖尾严重,因此均不适合于黄芪药材的蛋白质电泳。而以双蒸水(2号)为提取溶剂时可辨识的谱带数目最多,为 14 条,清晰度较好,指纹图谱中各峰的分度度较好,辨识度更高,因此更适用于建立黄芪药材的蛋白质指纹图谱。

### 3 讨论

目前 RAPD, RFLP, AFLP 等 DNA 指纹图谱技术应用广泛,可以直接反映物种基因水平上的差异,但仍存在实验设备及生化试剂昂贵、操作程序复杂等缺点<sup>[9]</sup>;相比而言,蛋白质 PAGE 技术具有快速高效、成本低、电泳谱带稳定、重复性良好等优点,适合

实际应用与推广。

蛋白的含量、纯度是评价蛋白提取方法的重要指标<sup>[10]</sup>。本研究应用 PAGE 技术对 8 种黄芪药材蛋白提取方法进行了比较筛选,结果表明 8 种不同提取溶剂得到的蛋白电泳图谱中共有特征谱带明显,但是不同方法提取的蛋白质的含量和纯度有较大差异,并直接影响 PAGE 结果。植物蛋白提取试剂盒提取的蛋白质含量最高,其原因可能与高浓度的尿素能增强蛋白溶解有关<sup>[7]</sup>,但该方法蛋白电泳条带分离度差。TCA-丙酮法和改良饱和酚法提取的蛋白纯度较高,但由于提取步骤复杂,且提取效率较低,条带缺失较多,因此均不宜用于黄芪药材蛋白质 PAGE 指纹图谱研究。直接提取方法中以超声水提的效果最好,电泳谱带清晰,辨识率高,同时蛋白提取效率较高、杂质相对较少,更适合用于黄芪药材蛋白指纹图谱研究。本研究结果为建立黄芪药材生物指纹图谱和药材质量的控制提供了重要的试验依据。

### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:283.  
 [2] 谢小龙,李毅. 蒙古黄芪 2 种表型种子的可溶性蛋白电泳分析[J]. 种子,2013,32(2):67-68.  
 [3] 钱丹,黄璐琦,崔红光,等. 黄芪种质资源的研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(3):86-88.  
 [4] 闫冲,聂凤,白楠. 安国地产黄芪及混淆品种子的蛋白质电泳鉴别[J]. 时珍国医国药,2005,16(4):289-291.  
 [5] 包华音. 中药壁虎质量控制关键技术与质量评价体系研究[D]. 济南:山东中医药大学,2012.  
 [6] 沙月霞,简桂良,肖崇刚,等. 棉叶总蛋白提取及 SDS-PAGE 电泳的改良[J]. 棉花学报,2005,17(3):146-147.  
 [7] 李晓琳,邵爱娟,陈敏,等. 酸浆种子蛋白提取方法的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(1):14-17.  
 [8] 包华音,石俊英. 不同产地和不同部位的壁虎药材蛋白质比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):69-71.  
 [9] 石俊英,卢燕,徐凌川,等. 三组中药的电泳指纹图谱研究[J]. 中药材,2002,25(12):864-866.  
 [10] 宋艳梅,李峰,周丽曼. 瓜蒌种子蛋白质 6 种提取方法比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(4):95-97.

[责任编辑 顾雪竹]