

# 不同产地和不同部位的壁虎药材蛋白质比较研究

包华音, 石俊英\*

(山东中医药大学, 济南 250355)

**[摘要]** 目的: 为中药壁虎质量标准的制订与资源开发提供科学的实验依据及可靠的实验方法。方法: 提取不同产地的无蹼壁虎药材不同部位(壁虎体与壁虎尾)的水溶性蛋白质, 并对其进行含量测定和聚丙烯酰胺凝胶电泳, 比较壁虎药材蛋白质含量和组成的产地差异和部位差异。结果: 不同产地壁虎药材的蛋白质含量不同, 同一产地壁虎药材的不同部位蛋白质含量也存在差异。蛋白质电泳图谱显示, 除共有条带外, 同一提取部位的蛋白条带的分布位置和数量随产地存在一定差异。结论: 考马斯亮蓝染色法简便、快速, 标准曲线线性关系良好, 可以用来进行蛋白质含量的测定。聚丙烯酰胺凝胶电泳实验快速、准确、重复性好, 得到的蛋白质电泳指纹图谱可作为壁虎药材质量评价和资源开发的重要依据之一。

**[关键词]** 无蹼壁虎; 蛋白质; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0069-04

## Comparative Study of the Body and Tail Protein of *Gekko swinhonis* from Different Habitats

BAO Hua-yin, SHI Jun-ying\*

(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

**[Abstract]** **Objective:** To provide scientific experimental basis and reliable methods for establishing the quality standards and exploiting resources of the traditional Chinese medicine *Gekko swinhonis*. **Method:** To compare the habitat and organ difference of protein, the water-soluble protein of different parts (body and tail) of *G. swinhonis* from different habitats was extracted. The protein contents were determined and the experiments of PAGE were conducted. **Result:** The protein content of *G. swinhonis* varied with the habitat, and it also varied with the part from the same habitat. The PAGE electrophoretogram showed that except for the common bands, there was difference in the distribution and number of the protein bands among different samples. **Conclusion:** The method of coomassie brilliant blue staining is simple and fast with good correlation coefficient, and can be used to determine the protein content of medicinal materials. The experiment of PAGE is rapid, accurate and reproducible, and the protein electrophoresis fingerprint can serve as one of the important bases for the quality evaluation and resources exploitation of *G. swinhonis*.

**[Key words]** *Gekko swinhonis*; protein; polyacrylamide gel electrophoresis; content determination

壁虎又名守宫、蝎虎、天龙等, 为壁虎科动物无蹼壁虎 *Gekko swinhonis* Güenther 等的全体。其味

咸, 性寒, 有小毒。具有祛风定惊, 解毒散结的功效<sup>[1]</sup>。近年来, 壁虎逐渐引起医药界的广泛关注, 并作多种剂型入药。蛋白质和多肽广泛存在于动物类中药<sup>[2]</sup>, 动物类药材的蛋白质含量较高。近年来的研究得知, 许多蛋白质和多肽是动物药中的有效成分<sup>[2]</sup>。应用蛋白质电泳技术对动物类药材进行分析研究, 结果重复性好, 谱带稳定且分辨率高<sup>[3]</sup>。壁虎目前未载入《中国药典》, 也没有部颁的质量评价标准。本研究首次采用考马斯亮蓝染色法分析测定了不同产地壁虎药材不同部位的蛋白质含量, 并

**[收稿日期]** 20110411(021)

**[基金项目]** 《山东省中药材标准》2012 版标准研究

**[第一作者]** 包华音, 博士研究生, 讲师, 从事中药资源与质量控制, Tel: 13064057985, E-mail: baohuayin@163.com

**[通讯作者]** \* 石俊英, 教授, 博士研究生导师, 从事中药资源与质量控制, Tel: 15169074981, E-mail: sjy5012@126.com

分别对不同产地不同部位的壁虎药材蛋白质样品进行了聚丙烯酰胺凝胶电泳比较分析,进而考察无蹼壁虎的药材质量,以期为中药壁虎质量标准的制订与资源开发提供科学的实验依据。

### 1 材料

**1.1 仪器** DYY-III 型稳流稳压电泳仪(北京六一仪器厂)、DYY-III 28 型电泳仪槽(北京六一仪器厂),LGR16-W 高速冷冻离心机(北京医用离心机厂),超声波清洗器(KQ2200,昆山市超声仪器有限公司),CP225D 型电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司),UV-754 型紫外-可见分光光度计(上海第三分析仪器厂),50  $\mu\text{L}$  微量进样器(上海医用激光仪器厂)。

**1.2 试剂** 凝胶制备所需的试剂按常规方法配制,浓缩胶液(3%),分离胶液(7%)。所用化学试剂、药品均为分析纯并新鲜配制,水为双蒸水。

**1.3 药材** 无蹼壁虎药材购自药房及药材市场,药材来源见表 1,2。所用药材经由山东中医药大学中药质量控制与评价实验室专家鉴定均为无蹼壁虎。

表 1 不同产地壁虎体药材总蛋白含量测定(n=3)

样品	产地	$\bar{X}$	RSD/%	蛋白含量/%
1	山东济南	0.422 3	0.956 9	0.779 1
2	山东泰安	0.427 3	0.945 7	0.788 6
3	安徽亳州	0.274 0	0.965 6	0.498 8
4	山东菏泽	0.571 3	0.898 2	1.060 7
5	河北祁州	0.598 0	0.836 1	1.111 0
6	山东济宁	0.308 3	0.990 8	0.563 7
7	河南商丘	0.530 0	0.864 6	0.982 6
8	安徽太和	0.433 3	1.040 6	0.799 9

表 2 不同产地壁虎药材尾部总蛋白含量测定(n=3)

样品	产地	$\bar{X}$	RSD/%	蛋白含量/%
1	山东济南	0.273 3	0.920 7	0.497 6
2	山东泰安	0.311 7	0.980 2	0.570 0
3	安徽亳州	0.317 0	0.834 6	0.580 1
4	山东菏泽	0.489 0	0.818 0	0.905 1
5	河北祁州	0.672 7	0.845 3	1.252 1
6	山东济宁	0.413 3	0.777 7	0.762 1
7	河南商丘	0.535 7	0.939 6	0.993 3
8	安徽太和	0.563 7	0.512 1	1.046 2

### 2 方法和结果

**2.1 蛋白质含量测定标准曲线的制作** 参照 Bradford 法<sup>[4]</sup>。配制 BSA 标准溶液(0.1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )并分别取 0,100,200,400,600,800,1 000  $\mu\text{L}$ ,用双蒸水补至 1 mL 体系,后向该体系中加入 5 mL 10% 考马斯亮蓝 G250 染色 5 min,用 UV-754 型紫外-可见

分光光度计于 595 nm 比色测定吸光度。以蛋白质质量浓度( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )为横坐标、吸光度为纵坐标,线性回归,制作标准曲线。得方程  $Y = 6.615 4X + 0.01$ ,  $r = 0.999 0$ ( $n = 6$ )。结果表明曲线线性关系良好,可以用来进行蛋白质含量的测定。

**2.2 样品的制备** 取适量无蹼壁虎的干燥全体,将其分为壁虎体和壁虎尾两部分,分别研磨成药材细粉。分别精确称量细粉 0.400 0 g,加入 1.5 mL 稀释 4 倍的浓缩胶缓冲液,研磨成匀浆状。超声提取 30 min,转移至离心管中,8 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  冰冻离心 10 min,收集上清液至新的离心管中,12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  冰冻离心 10 min,收集上清液。加入等体积的 40% 蔗糖溶液,混匀,置冰箱中备用。

**2.3 总蛋白含量的测定** 分别取离心后的上清液 30  $\mu\text{L}$  各 3 份,用双蒸水补至 1 mL,后加入 5 mL 10% 考马斯亮蓝 G250 染色 5 min,用 UV-754 型紫外-可见分光光度计于 595 nm 比色,测定吸光度。根据所制作的标准曲线,计算出样品中总蛋白的百分含量。结果见表 1,2,图 1,2。

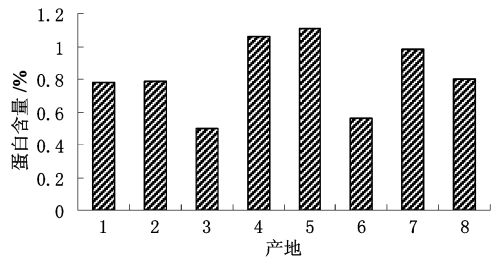


图 1 不同产地壁虎体蛋白含量

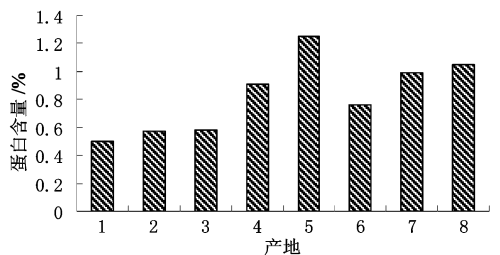


图 2 不同产地壁虎药材尾部蛋白含量

从图 1 可见,不同产地来源的壁虎体蛋白质百分含量有明显的差异。本研究中壁虎体蛋白含量高低顺序为河北祁州 > 山东菏泽 > 河南商丘 > 安徽太和 > 山东泰安 > 山东济南 > 山东济宁 > 安徽亳州,其中河北祁州产的壁虎体蛋白含量为安徽亳州的 2.2 倍。

从图 2 可见,壁虎尾部蛋白含量随产地来源也有显著差异。本研究中不同产地壁虎尾部的蛋白含量高低顺序为河北祁州 > 安徽太和 > 河南商丘 > 山东菏泽 > 山东济宁 > 安徽亳州 > 山东泰安 > 山东济

南,其中河北祁州产壁虎尾部蛋白含量为山东济南的 2.5 倍,为安徽亳州的 2.2 倍。

对上述 8 个不同产地壁虎药材体部和尾部的蛋白质含量进行比较研究,结果不同产地壁虎所含有的水溶性总蛋白含量存在明显差异,其中河北祁州产的壁虎药材蛋白质含量明显高于其他产地,而且,同一产地的壁虎蛋白质含量也表现出器官差异性。

**2.4 电源槽安装和凝胶制备<sup>[5]</sup>** 安装好电泳槽,取 2~3 mL 融化的 2% 琼脂注入下槽内封底。取干燥洁净的烧杯,分别配制分离胶和浓缩胶。分离胶按分离胶贮液-分离胶缓冲液-0.56% 过硫酸铵-水(4:2:2:8)的比例配制,充分混匀,后加入四甲基乙二胺(TEMED)30  $\mu$ L。将分离胶液注入电泳槽的凝胶模子中,加入适量水封面,垂直静置聚合。浓缩胶按浓缩胶贮液-浓缩胶缓冲液-0.56% 过硫酸铵-40% 蔗糖溶液(1:0.5:0.5:2)的比例配制,充分混匀,后加入 TEMED 10  $\mu$ L。待分离胶凝固,吸出胶面多余水分,注入浓缩胶,插上样品槽模板。待浓缩胶聚合后拔出样品槽模板,并吸除样品槽里多余的水分。

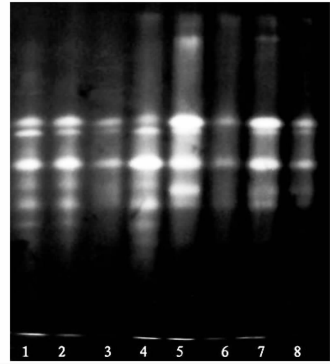
**2.5 上样和电泳** 用微量进样器向浓缩胶样品槽中各加入制备好的样品 30  $\mu$ L,将电极缓冲液倒入电泳槽中,加入 2 滴溴酚蓝指示剂示踪,接通电源。电泳开始时,设置恒定电流 14 mA,样品进入分离胶后调整恒定电流为 25 mA。待指示剂行至接近凝胶板下沿 1 cm 时,关闭电源,停止电泳。整个过程约需 3 h,为保证有效散热,电泳在 4  $^{\circ}$ C 冰箱内进行。

**2.6 染色与脱色** 取出凝胶,切去浓缩胶,保留分离胶并标记溴酚蓝前沿。放入染色液(20% 甲醇、7% 醋酸、0.1% 考马斯亮蓝 R250)中染色 1 h 左右。倾去染色液,经常更换脱色液(20% 甲醇、7% 醋酸),直至谱带背景清晰为止。将凝胶保存于 7% 醋酸溶液中。蛋白质电泳图谱见图 3,4。

从图 3,4 可见,同一产地壁虎药材不同部位的蛋白质电泳条带数量和分布没有显著差异。不同产地药材同一部位的蛋白质电泳共有特征谱带明显,条带在分布、数量、染色程度方面随产地存在一定差异。通过比对图 3 和表 1、图 4 和表 2 可以发现,条带的染色深浅与不同产地样品中蛋白质含量的高低相一致。

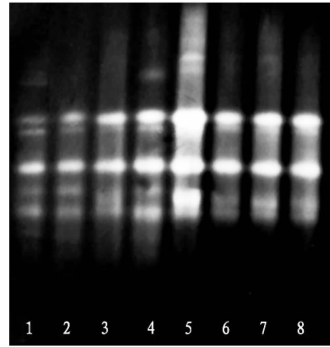
### 3 讨论

本研究首次提取了不同产地壁虎药材不同部位的水溶性蛋白质,并首次采用 Bradford 法测定了壁虎样品中的蛋白质含量。考马斯亮蓝染色方法在测定蛋白质含量方面具有简便、快速等优点,可以满足



1. 山东济南;2. 山东泰安;3. 安徽亳州;4. 山东菏泽;  
5. 河北祁州;6. 山东济宁;7. 河南商丘;8. 安徽太和

图 3 不同产地壁虎体蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱



1. 山东济南;2. 山东泰安;3. 安徽亳州;4. 山东菏泽;  
5. 河北祁州;6. 山东济宁;7. 河南商丘;8. 安徽太和

图 4 不同产地壁虎尾部蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

本研究的要求。同时,标准曲线线性关系良好,可以用来进行蛋白质含量的测定。

不同产地同一部位壁虎药材的蛋白质电泳指纹图谱中,共有特征谱带明显,条带在分布和数量方面随产地存在一定差异。这可能是由于不同产地无蹠壁虎药材所含的蛋白质种类和组成不完全相同,也可能与等体积样品中蛋白质含量的高低有关,还有可能是在产地加工过程中部分蛋白质降解所致。具体原因有待进一步研究。

本研究中蛋白质电泳谱带清晰,条带分离较好,实验结果重复性较好。得到的蛋白质电泳指纹图谱可以有效区别出不同产地的壁虎质量差异,为壁虎的质量评价提供了可靠的实验依据,这在中药的质量控制方面具有重要意义。

大量的临床报道证明,壁虎对许多病症特别是对多种恶性肿瘤、结核病、骨髓炎、瘰疬、窦道等疑难杂症疗效确切,而且毒性甚小<sup>[6]</sup>。马蜂毒有直接杀伤肿瘤细胞的作用<sup>[7]</sup>,壁虎含有与马蜂毒相似的有毒物质及组织胺类、蛋白质<sup>[8]</sup>,因此推测壁虎的抗肿瘤作用可能与其蛋白质类成分有关,且壁虎蛋白

# 藿香正气滴丸质量标准提高研究

阚红玉<sup>1\*</sup>, 赵卫春<sup>2</sup>, 孙玉侠<sup>1</sup>, 吕曙华<sup>2</sup>, 王杰<sup>2</sup>, 曹凤兰<sup>1</sup>

(1. 天津天士力制药股份有限公司, 天津 300410; 2. 天津市药品检验所, 天津 300070)

**[摘要]** 目的:完善藿香正气滴丸的质量控制方法。方法:采用薄层色谱法鉴别处方中的广藿香油、白芷、厚朴、苍术、陈皮、甘草、紫苏叶油及半夏;采用高效液相色谱法测定处方中厚朴及陈皮的含量。色谱条件:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以乙腈-冰醋酸水溶液为流动相,梯度洗脱,检测波长294 nm。结果:在选定的薄层色谱条件下,色谱斑点清楚,分离效果较好;HPLC方法学考查表明处方中橙皮苷在0.199 1~3.982 0 μg( $r=0.999 9$ )、和厚朴酚在0.135 4~2.707 0 μg( $r=0.999 9$ )、厚朴酚在0.107 2~2.144 0 μg( $r=0.999 9$ )峰面积与其进样量线性关系良好,橙皮苷平均回收率为98.36%,RSD为0.86%;和厚朴酚平均回收率为100.60%,RSD 1.04%;厚朴酚平均回收率为98.11%,RSD 0.70%。结论:该方法快捷、准确,能够更加确切地反应制剂质量的真实情况。

**[关键词]** 藿香正气滴丸;薄层鉴别;高效液相色谱法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)01-0072-05

## Study of Improving Quality on Huoxiang Zhengqi Dripping Pill

KAN Hong-yu<sup>1\*</sup>, ZHAO Wei-chun<sup>2</sup>, SUN Yu-xia<sup>1</sup>, LV Shu-hua<sup>2</sup>, WANG Jie<sup>2</sup>, CAO Feng-lan<sup>1</sup>

(1. Tianjin Tasly Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China;

2. Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China)

**[Abstract]** **Objective:**To improve the quality standard of Huoxiang Zhengqi Dripping pill. **Method:**On the original basis, the TLC identification of atractylodes lancea, tangerine peel, perilla leaf, liquoric root, pineuia ternata and determination the content of honokiol and hesperidin by HPLC were also revised. The HPLC separation was performed on Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the mixture of acetonitrile-0.1% acetic acid water was used as mobile phase in gradient elution. The detection wavelength was 294 nm. **Result:**The

**[收稿日期]** 20110517(004)

**[通讯作者]** \* 阚红玉, 中药学药物分析硕士, 工程师, Tel:022-86342535, E-mail:khy820527@sina.com

组分对肿瘤细胞有一定的诱导调之作用<sup>[9]</sup>。因此,很有必要对壁虎进行系统、细致的深入研究,从而为中药资源的开发、利用以及新药质量标准的建立提供理论和实验依据。

### [参考文献]

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:400.

[2] 朱雪妍, 韦建华, 韦汉燕, 等. 动物药中蛋白和多肽的研究与开发[J]. 广西中医学院学报, 2005, 8(1): 68.

[3] 赵曦, 翟玉娟, 侯文峰, 等. 10种动物药材的蛋白电泳鉴别[J]. 中国中药杂志, 1993, 18(7): 396.

[4] Bradford M. A rapid and sensitive method for the

quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248.

[5] 石俊英. 中药电泳鉴别法及其在植物动物类中药应用的研究[J]. 山东中医学院学报, 1995, 19(2): 74.

[6] 叶云珍. 中药壁虎的研究进展[J]. 中药材, 2009, 32(7): 1160.

[7] 孙铁民, 傅瑶, 梁伟, 等. 马蜂毒对瘤细胞杀伤作用的实验研究[J]. 中医药学刊, 2003, 21(5): 681.

[8] 骆和生, 周岱翰. 常用抗肿瘤中草药简介(三)[J]. 新中医, 1978, 10(3): 39.

[9] 侯新楠. 壁虎抗肿瘤研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2008.

[责任编辑 蔡仲德]