

# 全蝎蛋白药效组分的生物鉴定法研究

王晶娟, 张贵君\*, 李奇豫

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[摘要] 目的: 研究全蝎蛋白药效组分的提取方法, 摸索全蝎蛋白药效组分 SDS-PAGE 的最佳电泳条件, 测定全蝎蛋白药效组分电泳图谱条带的大致分子质量, 确定其 SDS-PAGE 的表达特征, 从而建立全蝎蛋白药效组分的电泳鉴别法。方法: 采用水提与盐析法获得全蝎蛋白药效组分, 考马斯亮蓝法测定蛋白药效组分的蛋白质含量, SDS-PAGE 法和 Alpha Ease FC 4.0.0 软件测定全蝎蛋白药效组分的蛋白质相对分子质量。结果: 全蝎蛋白药效组分的蛋白质质量分数为 50.37%; 得到较好的全蝎蛋白药效组分的 10 条电泳谱带, 相对分子质量分别为 94.162 0, 66.400 0, 40.357 0, 27.541 0, 22.518 0, 19.520 0, 12.766 0, 11.190 0, 9.665 3, 8.534 2 KDa。结论: 这 10 条谱带是全蝎蛋白药效组分的特征谱带, 可用于全蝎蛋白药效组分的鉴别。

[关键词] 全蝎; 蛋白药效组分; 生物鉴定法

[中图分类号] R282.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)08-0094-02

## Study the Bioassay Method of Informational Active Components Alignment of Scorpion

WANG Jing-juan, ZHANG Gui-jun\*, LI Qi-yu

(School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] **Objective:** We studied the extracted method of informational active components alignment of scorpion, groped the best electrophoresis conditions, determined the molecular mass of informational active components alignment, assured the expressing characteristic of the electrophoretic bands, and set up the bioassay method of informational active components alignment of Scorpion. **Method:** We extracted scorpion by water and salt fractionation to obtain informational active components alignment, Coomassie brilliant blue method determined its protein content, and SDS-PAGE electrophoretic technique and Alpha Ease FC 4.0.0 software determined its protein molecular weight. **Result:** The protein content of informational active components alignment was 50.37%. There were ten bands in the informational active components alignment. Ten bands in the SDS-PAGE were 94.162 0, 66.400 0, 40.357 0, 27.541 0, 22.518 0, 19.520 0, 12.766 0, 11.190 0, 9.665 3, 8.534 2 KD. **Conclusion:** These ten bands were the characteristic bands of informational active components alignment, and might be used to identify the informational active components alignment.

[Key words] Scorpion; informational active components alignment; bioassay method

全蝎为钳蝎科动物全蝎 *Buthus martensii* Karsch. 的干燥虫体, 在我国分布广泛。现已经证明, 全蝎具有息风镇痉、攻毒散结、通络止痛等功效<sup>[1]</sup>。目前对全蝎蝎毒中的多肽<sup>[2]</sup>和蛋白质<sup>[3]</sup>研

究比较多, 但对全蝎中的蛋白质研究较少, 《中国药典》在全蝎的质量方面也仅测定其醇溶性浸出物的总含量。本文在中医临床用药的指导下, 通过对全蝎药材中蛋白药效组分的提取、含量测定与电泳分析, 探讨全蝎蛋白药效组分的生物鉴定法。

### 1 材料

全蝎药材均购自河北安国药材市场, 由北京中医药大学张贵君教授鉴定为正品。

离心机 (BECKMAN, 美国); 精密分析天平 (Sartorius, 德国); 超净工作台 (ESCO, 新加坡);

[收稿日期] 20100317(004)

[基金项目] 国家教育部科学技术研究重点项目(00167)

[第一作者] 王晶娟, Tel: (010) 84738624, E-mail: jingjuanw@163.com

[通讯作者] 张贵君, 教授, Tel: (010) 84738624, Fax: (010) 84738611, E-mail: guijunzhang@163.com

DYCZ-24E 电泳槽(北京六一仪器厂); Universal 电泳仪(BIO-RAD); USA MILLIPORE 反渗透纯水仪(上海新美生物技术研究所)。牛血清白蛋白, BSA(美国, Millipore); 考马斯亮蓝 R-250(进口分装, 国药集团化学试剂有限公司); 丙烯酰胺(北京华瑞新成科技有限公司); 甲叉双丙烯酰胺, 十二烷基硫酸钠, SDS(北京化学试剂公司)。

## 2 方法

**2.1 全蝎蛋白药效组分的提取** 将全蝎用烘箱于 30 ℃ 烘干。取 20.05 g 全蝎经粉碎机粉碎, 加入 300 mL 蒸馏水, 磁力搅拌器温和搅拌(30 min), 约 4 h 溶液呈过饱和状, 将溶液静置分层, 取出上层淡黄色提取液, 经在 4 ~10 ℃ 条件下 8 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min 取上清液进行抽滤, 得淡黄色透明液体。加水抽提重复实验直到硫酸铵盐析实验呈阴性为止, 得到总蛋白质溶液。用旋转蒸发仪将总蛋白质溶液浓缩至适量体积。按比例在浓缩液中加入硫酸铵盐析进行蛋白质纯化实验, 使其终浓度达到 90%。

4 ℃ 条件下 48 h 静置后, 得到淡黄色絮状沉淀。4 ~10 ℃ 条件下 6 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min 收集蛋白沉淀物, 用一定比例的蒸馏水溶解蛋白沉淀物, 在 18 ℃ 条件下温和搅拌 3 h 促溶, 待蛋白质溶解完全后离心, 收集上蛋白清液。将剩余沉淀物加入蒸馏水继续溶解, 搅拌促溶、离心, 收集上层蛋白溶液, 弃去杂质沉淀。合并上清蛋白溶液, 4 ℃ 下透析除盐, 3 d 后经钡盐检验证实透析完全。用旋转蒸发仪 40 ℃ 条件下充分浓缩透析后的蛋白溶液, 冷冻干燥, 最终获得 8.250 0 g 全蝎水溶性总蛋白质粉末。

**2.2 全蝎蛋白药效组分的含量测定** 采用考马斯亮蓝法进行测定。用牛血清白蛋白(BSA)制备标准蛋白质溶液, 考马斯亮蓝 G-250 作为染料, 得到标准曲线  $Y=1.2992X-0.0154$  ( $r=0.9996$ )。将每个供试品稀释后测定浓度, 作为预试验结果, 根据该结果, 调整稀释倍数, 进行结果测定。在 595 nm 下测定的吸光度值  $A_{595}$ , 与蛋白质浓度成正比。分别测定 3 次, 取平均值。

**2.3 SDS-PAGE 电泳分析** 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法对全蝎蛋白药效组分进行电泳, 电泳方法采用不连续胶系统, 3.9% 浓缩胶和 18% 分离胶, 考马斯亮蓝法染色, 标准相对分子质量蛋白为兔磷酸化酶 B(97.200 0 KDa), 牛血清白蛋白(66.400 0 KDa), 兔肌动蛋白(44.300 0 KDa), 牛碳酸酐酶

(29.000 0 KDa), 胰蛋白酶抑制剂(20.100 0 KDa), 鸡蛋清溶菌酶(14.300 0 KDa)。以监测全蝎蛋白药效物质各蛋白质组分蛋白质相对分子质量的分布情况。采用 Alpha Ease FC 4.0.0 进行条带识别和分子量计算。

## 3 结果

**3.1 全蝎蛋白药效组分的含量** 供试品分 3 个浓度梯度进行测定, A 值分别为: 0.044, 0.093, 0.135。根据标准曲线计算后取平均值, 得平均浓度为 0.102 4 mg · mL<sup>-1</sup>。最后得蛋白药效组分含量为 50.37%。

**3.2 SDS-PAGE 电泳** 对全蝎蛋白药效组分进行 SDS-PAGE 电泳, 能得到较好的全蝎蛋白药效组分的 10 条电泳谱带, 相对分子质量分别为 94.162 0, 66.400 0, 40.357 0, 27.541 0, 22.518 0, 19.520 0, 12.766 0, 11.190 0, 9.665 3, 8.534 2 KDa, 这 10 条谱带是全蝎蛋白药效组分的特征谱带, 可用于全蝎蛋白药效组分的鉴别。

## 4 讨论

全蝎的主要有效成分为蛋白质与核酸, 因此应该以全蝎蛋白的含量作为提取工艺的评价指标。此外, 没有法定的、现成标准品或对照品可以提供, 故难以用高效液相色谱法测定蛋白含量; 转而考虑用紫外分光光度法测定全蝎蛋白质类活性部位的含量, 采用考马斯亮蓝法测定全蝎中蛋白药效组分的含量。本实验采用 30 ℃ 温水浸提、硫酸铵盐析的方法可以得到全蝎的蛋白药效组分。采用 18% 的分离胶、3.9% 的浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳, 能得到较好的全蝎蛋白药效组分的 10 条电泳谱带是全蝎蛋白药效组分的特征谱带, 可用于全蝎蛋白药效组分的鉴别。

### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 北京: 化学工业出版社, 2005: 97.
- [2] 周新华. 蝎毒的生化研究及临床应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 1984, 4(2): 20.
- [3] 王琳, 魏俊杰, 张红军, 等. 东亚钳蝎蝎毒蛋白的分离纯化[J]. 白求恩医科大学学报, 1997, 23(2): 143.

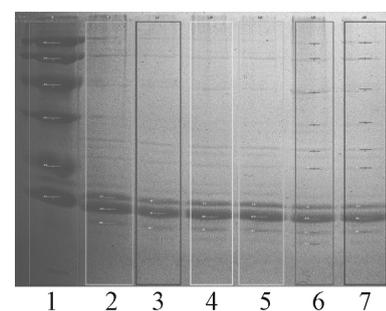


图 1 全蝎蛋白药效组分的电泳图谱

1. marker; 2 ~7. 不同浓度的全蝎蛋白药效组分