

燕窝鉴别中的蛋白质电泳研究

□林洁茹* (广州市中医医院 广州 510130)

董 燕 (广州中医药大学 广州 510405)

周 华 (香港浸会大学)

赖小平 王培训 (广州中医药大学 广州 510405)

摘要:目的:探讨 SDS-PAGE 和等电聚焦电泳应用于燕窝蛋白分离及燕窝鉴定中的可行性。方法:提取印尼燕窝、怀集燕窝及常作为伪品的明胶、银耳、猪皮的蛋白质,进行 SDS-PAGE 和等电聚焦电泳研究。结果:印尼燕窝与怀集燕窝在 SDS-PAGE 图谱上可见明显差异,而明胶、银耳和猪皮等伪品可见特征性蛋白条带。燕窝蛋白经等电聚焦电泳可见清晰的蛋白条带,且主要集中于酸性端。结论:SDS-PAGE 和等电聚焦电泳均可获得燕窝蛋白质的特征性电泳图谱,用于鉴别不同品种燕窝及掺伪燕窝是可行的。

关键词:燕窝 SDS-PAGE 等电聚焦电泳

燕窝为雨燕科(Apodidae)金丝燕属(Collocalia)多种燕类吞食海中小鱼或其它蚕螺海藻等小生物,消化后分泌出的唾液或唾液与羽绒混合凝结所筑成的窝巢。燕窝富含蛋白质、糖类和矿物质,具有养阴润燥,益气补中的功效,是宜药宜膳的昂贵药材,而一些伪充品在市场上层出不穷。燕窝属粘液质样的物质,其活性成分是糖蛋白、糖肽或唾液酸。其水提取液中有多种水溶性活性蛋白,如凝血抑制因子、病毒感染力中和剂、表皮生长因子、促细胞分裂物质等^[1-4]。电泳技术是分析蛋白质的理想方法。本文研究了不同产地燕窝及伪品的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和等电聚焦(IEF)电泳,探讨将电泳技术应用于燕窝鉴别中的可行性。

收稿日期:2005-10-20

修回日期:2006-06-06

* 联系人:林洁茹,女,副主任中医师,主要从事中药鉴定研究,电话:020-81886504-1724,E-mail:linjerry@21cn.com

一、材 料

1. 实验材料

印度尼西亚洞燕窝(由新加坡龙标公司提供),怀集燕窝(购于广东怀集县),明胶,银耳,猪皮。

2. 主要仪器设备

BIO-RAD 双向电泳系统,包括 IPGphor 等电聚焦电泳仪(526BR)、垂直电泳仪 Mini-Protein III、凝胶图像扫描仪(GS800)及 PDQuest 7.1.1 软件、溶胀盒和等电聚焦电泳槽;高速冷冻离心机(美国 Beckmen,GS-15R);紫外-可见分光光度计(惠普上海分析仪器公司,HP6010)。

3. 主要试剂

尿素、三羟甲基胺基甲烷(Tris)、过硫酸胺、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、3-[3-(胆酰胺基

丙基)二甲氨基]丙磺酸盐(CHAPS)、三丁基磷(TBP)、两性电解质载体(Pharmalyte, pH3~10)、石蜡油等均为 Sigma 公司产品;丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺为 Amersham pharmacia Biotech 公司产品;固相 pH 梯度干胶条(IPGstrip pH3~10, 7cm),为 BIO-RAD 公司产品;牛血清白蛋白(BSA)、苯甲基磺酰氟(PMSF)为华美生物工程公司产品;其它试剂均为国产分析纯或色谱纯。

二、实验方法

1. 燕窝蛋白的提取

将印尼燕窝研磨成粉末,分别称取 0.1g,按以下 4 种方法处理:①与 2mL 纯水混匀,在 4℃作用 24h。②与 2mL SDS-PAGE 电泳缓冲液 [3g/L Tris 碱, 14.4 g/L 甘氨酸, 1 g/L 十二烷基硫酸钠(SDS)]混匀,在 4℃作用 24h。③与 2mL SDS-PAGE 电泳缓冲液混匀,于 45℃作用 4h;处理后,4℃、8000 rpm 离心 10 min,吸取上清液。④称取燕窝粉末 0.03g,与 600 μ L 等电聚焦(IEF)电泳蛋白提取液(8.5mol/L 尿素, 4%CHAPS, 40 mmol/L Tris, 1% Pharmalyte, 2 mmol/L TBP, 0.1mmol/L PMSF)混合, 20℃处理 30min 后, 4℃、14 000 rpm 离心 30 min,吸取上清液。以 Bradford 法测定蛋白质浓度。

按提取方法③提取怀集燕窝及明胶、银耳和猪皮的伪品燕窝蛋白质。

2. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

燕窝蛋白质样品与 5 倍的 SDS 凝胶加样缓冲液按 4:1 混合后,沸水浴 100℃加热 3~5min,上样,在恒压 198 V 下进行 SDS-PAGE (6%浓缩胶, 15%分离胶),以考马斯亮蓝染色。凝胶图像扫描仪扫描图像,分析结果。

3. 等电聚焦电泳

按上述方法④提取印尼燕窝蛋白,稀释样品至蛋白浓度约 1 μ g/ μ L,加入适量溴酚蓝,取 125 μ L 样品液泡胶,即上样与再水化同步进行,室温被动溶胀 14h,将胶条移至等电聚焦(IEF)电泳槽中,开始等电聚焦。等电聚焦程序:250V, 30min; 500V, 1h; 4000V, 1h;最后稳定于 4000V,累计 8000Vh,停止电泳,以考

马斯亮蓝染色。

三、结果

1. 不同提取方法比较

从 Bradford 法测定蛋白质含量结果(见表 1)及电泳结果(见图 1)可知,方法①、②提取的蛋白质浓度很低,方法③提取的蛋白质浓度较高,且条带也更为清晰。3 种方法提取的蛋白电泳图谱特征相似。说明分别以水、SDS-PAGE 电泳缓冲液在 4℃、45℃条件下处理对燕窝蛋白的稳定性影响不大,而以 SDS-PAGE 电泳缓冲液在 45℃处理 4h 有利于燕窝蛋白的溶解。

以等电聚焦的样品提取液处理燕窝(方法④),该样品液中的成分,如尿素、CHAPS、Tris、两性电解质载体等都有促进蛋白溶解的作用,所得蛋白浓度较高。

2. 燕窝及其伪品的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

对印尼燕窝、怀集燕窝以及常作为伪品的明胶、银耳、猪皮进行 SDS-PAGE 分析,结果见图 2。印尼燕

表 1 不同提取方法的燕窝蛋白质浓度

	方 法			
	①	②	③	④
A595	0.018	0.019	0.063	0.079
浓度 (μ g/ μ L)	—	—	0.75	1.02

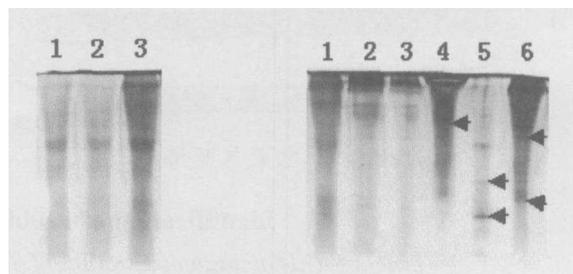


图 1 SDS-PAGE 分析
SDS-PAGE 图谱
(泳道 1,2,3 为方法①②③的提取液,上样 20 μ L 孔)

图 2 不同样品蛋白质的
(1 印尼燕窝, 2,3 怀集燕窝, 4 明胶, 5 银耳, 6 猪皮;
泳道 3 上样 2 μ L, 其余均 10 μ L)

窝与怀集燕窝在 SDS-PAGE 图谱上可见明显差异,因此在对燕窝的品种、产地进行鉴定时,应以相应的标准品作对照。明胶、银耳和猪皮可见清晰的蛋白条带,图中箭头所示为明显不同于燕窝的蛋白条带,且这几种蛋白浓度较高,条带清晰,可作为添加该类伪品的标志。

3. 燕窝蛋白的等电聚焦分析

印尼燕窝蛋白在 pH3~10 的 IPG 胶条上可见清晰的蛋白条带(图 3),且蛋白条带主要集中于酸性端,说明等电聚焦方法能较好地分离燕窝蛋白,表现出特征性电泳图谱,且燕窝蛋白主要是酸性蛋白。燕窝的等电聚焦图谱特征可作为鉴别燕窝真伪品的依据。

四、讨 论

燕窝蛋白是其重要的活性成分,本文通过 SDS-PAGE 分析印尼燕窝、怀集燕窝及明胶、银耳、猪皮的 3 种伪品燕窝的蛋白提取液,在电泳图谱中可见特征性差异。我们进一步以等电聚焦法分离燕窝蛋白,结果在 pH3~pH10 的胶条上燕窝蛋白主要集中于酸性端,并可见清晰的蛋白条带,呈现燕窝蛋白的特征图谱。此外,研究结果说明燕窝蛋白中主要是酸性蛋白,这与燕窝中的特征性物质-唾液酸糖蛋白为主要成分是相一致的。应用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析燕窝蛋白质来进行燕窝鉴别的研究虽然已有报道^[5-6],

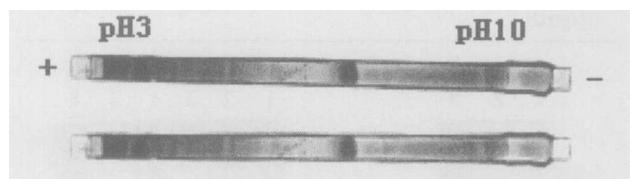


图 3 等电聚焦图谱

Identification of Edible Bird's Nest with Electrophoresis

Lin Jie-Ru (Guangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine Guangzhou 510130)

Dong Yan, Lai Xiao-Ping (Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine Guangzhou 510405)

Zhou Hua (HongKong Baptist University, HongKong)

Object: To probe the feasibility of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and isoelectrofocusing
(Continued on page 84)

但未见其原始电泳图谱。Yusof 等^[7]报导 SDS-聚丙烯酰胺电泳可成功分离燕窝蛋白, Keli 等^[9]则报道以双向电泳技术分析燕窝蛋白,但双向电泳操作复杂。本文采用等电聚焦电泳较好地分离了燕窝蛋白,并表现出特征性图谱,因此本文为燕窝鉴别研究提供了直接的依据。

总之,通过 SDS-PAGE 和等电聚焦电泳可揭示不同品种燕窝及伪品的差异,在本研究基础上可进一步研究多种燕窝品种及伪品,建立其特征性图谱,为燕窝鉴别提供依据。

参考文献

- 1 Howe Calderon Lee, Lucille T., Rose, Harry M. Influenza virus sialidase. Nature (London, United Kingdom) 1960; 188: 251-252.
- 2 Biddle F., Belyavin G. The hemagglutination inhibitor in edible bird nest; its biological and physical properties. Journal of General Microbiology 1963; 31: 31-44.
- 3 Ng M.H., Chan K.H., Kong Y.C. Potentiation of mitogenic response by extracts of the swiftlet's (Collocalia) nest. Biochemistry international 1986; 13(3): 521-531.
- 4 江润祥, 吴文瀚. 怀集石燕窝促细胞分裂活性的研究. 动物学报 1989; 35(4): 429-435.
- 5 于国平. 燕窝及其伪品的凝胶电泳鉴别. 中国医院药学杂志, 1996; 16(4): 172.
- 6 胡珊梅, 赖东美. 燕窝的聚丙烯酰胺凝胶电泳法鉴别. 中国中药杂志, 1999; 24(6): 331.
- 7 Yusof R., Di Napoli A., Hamid H., et al. Identification and purification of biologically active components in swiftlet (Aerodramus fulicphagus) nest extracts. Proceedings of the Malaysian Biochemical Society Conference 1994; 19th: 178-180.
- 8 Ou Keli Seow, Teck K., Liang Rosa C. M. Y., etc al. Identification of a serine protease inhibitor homologue in Bird's Nest by an integrated proteomics approach. Electrophoresis, 2001; 22 (16): 3589-3595.

- Tianjihuang by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection. *Journal of Chromatography A*, 2005,1070:35-4.
- 7 Xie P., Chenb S., Liang Y.Z., Wang X.H., Tian R.T., Upton R., Chromatographic fingerprint analysis—a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine. *Journal of Chromatography A*, 2006,1112:171-180.
- 8 Yan S.K., Xin W.F., Luo G.A., Wang Y.M., Cheng Y.Y., An approach to develop two-dimensional fingerprint for the quality control of Qingkailing injection by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 2005,1090:90-97.
- 9 谢培山. 色谱指纹图谱分析是中草药质量控制的可行策略, *中药新药与临床药理*, 2001,12(3):141-151.
- 10 罗国安, 王义明. 多维多息特征谱及其应用, *中成药*, 2000,22(6):395-397.
- 11 梁鑫森. 智能多模式多柱色谱系统及其联用技术, *色谱*, 1995,13(5):307-309.
- 12 肖红斌, 梁鑫森, 卢佩章, 陈志坚. 中药复方分析新方法及其应用, *科学通报*, 1999,44(6):588-596.

The Systemic chemical characterization of multi-components of Traditional Chinese Medicine

Zhang Feifang, Zhang Feng, Xue Xingya, Xu Qing, Jin Yu, Liang Xinmiao

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023)

The chemical characterization of Traditional Chinese Medicine (TCM) is an important tache in the realization of its modernization. The concept of "homologue components" was brought forward to enrich the theory of multi-components Chinese medicine (MCCM) on the basis of development status of TCM. The design of the study on systemic chemical characterization was expatiated across-the-board from the following aspects: the characterization of standard samples, the characterization of high polar multi-components, the characterization of "homologue components", the separation and characterization with multi-dimension and multi-mode chromatography combined their hyphenated techniques and the methods and techniques of quality controlling. The systemic technique were applied in order to thoroughly make clear of chemical constitutions of TCM and to build up the strict quality controlling system during the production of TCM

Keyword: Modernization of TCM, homologue components, systemic chemical characterization, quality controlling

(责任编辑:王 瑀, 责任编审:柳 莎, 张志华, 责任译审:熊艳艳)

(Continued from page 32)

(IEF) in the separation and identification of proteins of Edible Bird's Nest (EBN). Methods: SDS-PAGE was performed with samples including Indonesia EBN, EBN from Huaiji of Guangdong Province and three impure EBN samples which were added with gelatin, white fungus or pork skin respectively. IEF was also performed with Indonesia EBN. Results: On SDS-PAGE patterns, there were obvious differences between Indonesia EBN and Huiji EBN, and clear proteins stripes of three impure EBN were visualized. On IEF pattern, clear proteins stripes which focus on the acidic end were visualized. Conclusions: SDS-PAGE can be used in identification of EBN and IEF can be used to produce characteristic pattern of EBN by separating proteins.

Keywords Edible bird's nest; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; Isoelectrofocusing; Electrophoresis

(责任编辑:左 向, 责任编审:张志华, 责任译审:凌仰之)