

不同地域东亚钳蝎蝎毒的双向电泳鉴定

倪伊婷¹, 郭美华¹, 王君德², 刘赞³, 辛毅¹, 吴大畅¹

(1. 大连医科大学生物技术系, 116044; 2. 大连医科大学国有资产管理处, 116044; 3. 天津医科大学 2008 级医学检验专业, 300070)

摘要 目的 利用蛋白质组学中双向电泳技术, 定性鉴定、分析不同地域东亚钳蝎蝎毒活性的差别, 探索不同产地蝎毒的蛋白质组成及功能差异。方法 将不同产地的冷冻干燥蝎毒粉经溶解、除盐、浓缩后测定蝎毒蛋白质含量, 进行定量的蝎毒鉴定。采用 pH 梯度等电聚焦和 SDS-PAGE 凝胶电泳技术分离蝎毒蛋白质。银染后通过凝胶成像系统获得双向电泳凝胶图谱, 用 PD Quest 图像分析软件比较分析, 确定差异的特征蛋白点, 从而定性鉴定不同产地蝎毒。结果 获得 3 个样品的蛋白质指纹图谱。分别检测出 80, 69 和 77 个点, 特征差异蛋白点依次为 56, 46 和 55 个。结论 不同产地的东亚钳蝎蝎毒通过双向电泳分离蛋白后, 表现出明显不同的蛋白点分布。

关键词 蝎毒; 东亚钳蝎; 双向电泳; 鉴定

中图分类号 R282.74; R927

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2012)09-1200-03

Identification of Scorpion Venom in *Buthus Martensii* Karsch from Different Regions by Two-dimensional Gel Electrophoresis (2-DE)

NI Yi-ting¹, GUO Mei-hua¹, WANG Jun-de², LIU Yun³, XIN Yi¹, WU Da-chang¹ (1. Biotechnology Department of Dalian Medical University, Dalian 116044, China; 2. State-owned Property Management Department of Dalian Medical University, Dalian 116044, China; 3. Medical Laboratory Speciality of Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

ABSTRACT Objective To identify qualitatively and analyze the activity of scorpion venom in *Buthus Martensii* Karsch from different regions by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), and investigate the protein composition and function differences of scorpion venom. **Methods** Quantitative identification and content determination of proteins in scorpion venom were performed following preconditions including dissolution, desalting and condensing of the freeze-drying scorpion venom powder. The proteins in scorpion venom were separated by pH gradient isoelectric focusing and SDS-PAGE gel electrophoresis. The two-dimensional electrophoresis gel map was captured via gel imaging system after silver staining. The special different proteins were determined and comparatively analyzed through PD Quest image analysis software, and thus the scorpion venom from different regions was qualitatively identified. **Results** Protein fingerprints were acquired from three samples. Total protein spots were 80, 69, 77, and the distinctive number of which were 56, 46, 55, successively. **Conclusion** Scorpion venom in *Buthus Martensii* Karsch from different regions separated with 2-DE show obviously diverse protein distributions.

KEY WORDS Scorpion venom; *Buthus Martensii* Karsch; Two-dimensional gel electrophoresis; Identification

蝎毒是我国传统中药的宝贵资源, 中医认为它具有熄风镇痉、攻毒散结、通络镇痛的功效^[1]。主要用于治疗癩、卒中、痹痛、癌症等疾病。蝎毒主要由非蛋白和蛋白质两部分组成^[2], 其主要的活性成分是蛋白质^[3]。东亚钳蝎是我国分布最广的蝎种^[4], 亚种类繁多, 致蝎毒的药物功效有很大差别, 临床用药选择存在困难。已有利用凝胶过滤、离子交换高效液相色谱等方法进行蝎毒分离纯化的报道, 亟需一种可靠稳定的鉴定方法^[5]。

双向电泳是将样品电泳后根据不同的目的在垂直方向再进行一次电泳, 经过两次分离后, 在凝胶上显示出的蛋白点可以获得蛋白质等电点和相对分子质量信息。双向电泳作为分离蛋白质的经典方法, 是蛋白质组学关键技术, 因其高分辨率、高效性而广泛应用于细胞、组织等样品中的复杂蛋白混合物分析^[6]。

笔者选用购自不同产地的东亚钳蝎蝎毒冷冻干粉, 运用双向电泳技术获得不同产地东亚钳蝎蝎毒的差异蛋白点, 从而达到高效稳定鉴定不同产地蝎毒的目的, 为临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验药材 东亚钳蝎蝎毒冷冻干粉: 1 号, 产自山东省枣庄市; 2 号, 产自河南省洛阳市; 3 号, 产自河南省新乡市。-20℃保存。

1.2 仪器及试剂 高压电泳仪(北京君意东方电泳

收稿日期 2011-12-21 修回日期 2012-03-01

作者简介 倪伊婷(1988-), 女, 广东人。电话: 0411-86110351, E-mail: dachangdl@yahoo.com.cn。

通讯作者 吴大畅(1977-), 女, 辽宁人, 讲师, 硕士, 研究方向: 蛋白质组学。电话: 0411-86110351, E-mail: dachangdl@yahoo.com.cn。

设备有限公司);MV-II 型垂直板电泳槽及等电聚焦电泳槽(大连竞迈生物科技有限公司);酶标仪(Thermo electron corporation);GL20A 全自动高速冷冻离心机(湖南仪器仪表厂离心机厂);pH 计(意大利 HANNA 公司);载体两性电解质、丙烯酰胺等(美国 Sigma 公司)。

1.3 分析软件 PD Quest 8.0。

1.4 蝎毒的预处理 采用 Sephadex G-50 凝胶过滤和透析,将蝎毒冻干粉 100 mg,溶于三蒸水 1 mL 中,4 °C,12 000×g 离心 15 min,将上清加入 Sephadex G-50 柱(直径 0.8 cm,长 4 cm),三蒸水洗脱后装入已处理好的透析袋,4 °C 搅拌过夜。经低温离心浓缩获得除盐的蝎毒液,-20 °C 保存备用。

1.5 固相 pH 梯度双向凝胶电泳 取预处理的蝎毒液,考马斯亮蓝法定量测定蝎毒蛋白质含量^[7-8]。按 GORG 等^[9]的方法进行固相 pH 梯度双向凝胶电泳。

1.6 凝胶图像分析 凝胶成像系统拍摄图像,PD Quest 8.0 软件比较分析,在 1 号、2 号和 3 号样品之间进行消减,斑点检测,匹配,量化分析,确定不同地区东亚钳蝎蝎毒的特征蛋白点。

2 结果

2.1 蝎毒中蛋白质的定量 以(BSA)为标准蛋白,绘制标准曲线,考马斯亮蓝法检测样品蛋白质浓度,结果见图 1。

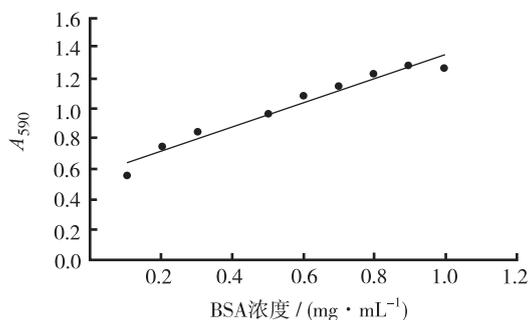


图 1 BSA 标准曲线

Fig.1 Standard curve of BSA

BSA 标准曲线: $Y = 0.7917X + 0.5620$ (公式 1) ($R^2 = 0.9558$),由此计算各样品蛋白质浓度依次为: 2.72, 5.47 和 2.69 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。说明等量的不同产地东亚钳蝎蝎毒干粉中蛋白质含量不同。

2.2 不同地域蝎毒的双向电泳图谱 双向电泳银染凝胶图谱经 PD Quest 8.0 软件分析显示,样品 1~3 分别检测出 80, 69 和 77 个点(绿色框标记表示匹配的点,红色标记表示样品特征蛋白点)。特征差异蛋白

点依次为 56, 46 和 55 个。不同地域蝎毒蛋白质双向电泳图谱见图 2~5 和表 1。

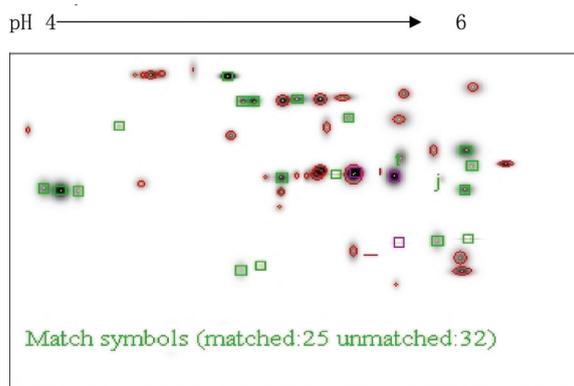


图 2 所有样品的斑点叠加组合图

Fig.2 The overlaid gel images of all samples

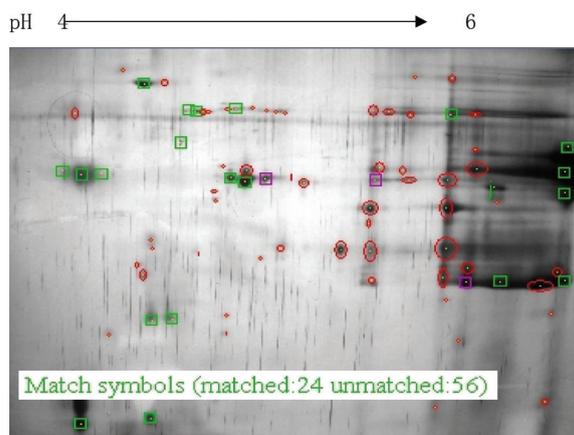


图 3 样品 1 的双向凝胶电泳图谱(银染)

Fig.3 Representative 2-DE patterns of sample 1 (silver staining)

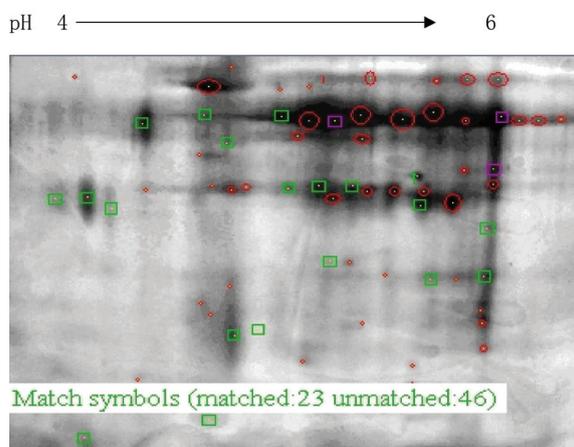


图 4 样品 2 的双向凝胶电泳图谱(银染)

Fig.4 Representative 2-DE patterns of sample 2 (silver staining)

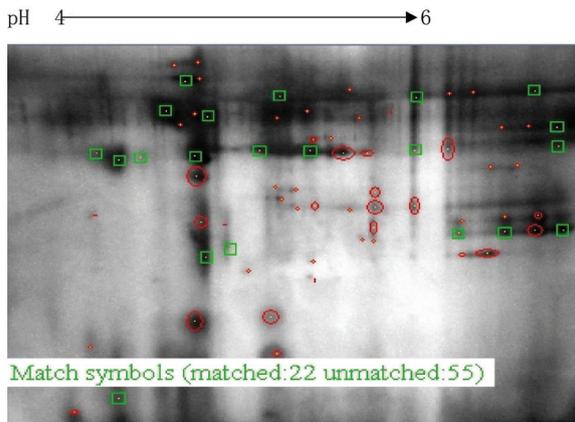


图5 样品3的双向凝胶电泳图谱(银染)

Fig. 5 Representative 2-DE patterns of sample 3 (silver staining)

表1 斑点检测和匹配结果

Tab. 1 Spot detection and matching result

样品	蛋白点	匹配点	差异点	匹配率/%	
				1	2
样品1	80	24	56	30.0	42.1
样品2	69	23	46	33.3	40.4
样品3	77	22	55	28.9	38.6

3 讨论

蝎毒是一种复杂的生物毒素类有机混合体系,需要从整体水平对体系进行控制^[10]。现代技术展示了这种可能性。几个不同的混合体系在相同仪器、相同实验条件、相同操作方法下所得的实验结果数据具有相同性,同时也具有特异性。不仅可以定性地对未知体系进行鉴别,还可以半定量分析。

有学者曾用 Glaspac Column TSK G3000 SW 胶过滤、离子交换高效液相色谱等方法分离我国不同地区东亚钳蝎蝎毒种类及含量^[11-12]。王琳等^[4]首次分离纯化出相对分子质量在2万以上的蝎毒蛋白,突破了以往国内外认为蝎毒是多肽混合物的研究报道^[13],蝎毒广泛药理学性质可能与其化学成分之复杂有关。笔者利用透析除盐和 Sephadex G-50 凝胶过滤层析分离纯化蛋白,运用双向电泳技术,检测不同产地东亚钳蝎蝎毒的大分子蛋白成分的不同,提示成分的差别可能

与活性有关。此结果与沈东海等^[5]进行的 HPLC 分离纯化不同产地的蝎毒相比,具有更高的分辨率,筛选出大量特征差异点,为蛋白质组学进一步研究提供了有效的前期实验数据。可进行相关活性的检测,选择最适地域的蝎毒,分析其特征蛋白点,进行质谱鉴定,从而得到单一成分或者简单混合物的有效活性成分。以期进一步扩大蝎毒的临床应用和开发利用。

参考文献

- [1] 王兆朋,张维东. 东亚钳蝎蝎毒溶纤活性蛋白的提取及其体外溶栓特性研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(2): 218-220.
- [2] 周新华. 蝎毒[J]. 生物化学与生物物理进展,1982,9(4):25-30.
- [3] 王燕平,吕欣然. 东亚钳蝎蝎毒分离纯化及药理作用的研究进展[J]. 中草药,2000,31(1):59-61.
- [4] 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):143-144.
- [5] 沈东海,高春芳. 不同产地蝎毒的提纯分析[J]. 实用医药杂志,2007,24(11):1321-1323.
- [6] 许克新,王云川. 双向电泳及质谱分析与蛋白组研究[J]. 第四军医大学学报,2002,23(22):2017-2022.
- [7] 陈晓梅,刘雅文,程熠,等. 考马斯亮蓝蛋白定量标准曲线稳定性观察[J]. 中国公共卫生,2006,22(3):380-381.
- [8] 李闻捷,范华杰,蔡刚. 蛋白质定量方法的局限性及合理应用[J]. 临床检验杂志,2004,22(3):210.
- [9] GORG A, OBERMAIER C, BOGUTH G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients [J]. Electrophoresis, 2000, 21(6): 1037-1053.
- [10] 任德权. 中药指纹图谱质控技术的意义与作用[J]. 中国新药与临床药理,2001,12(3):135-140.
- [11] 张景海,王起振,周新华. 我国不同地区东亚钳蝎(*Buthus martensii* Karsch)毒在三种类型电泳中的比较研究[J]. 天然产物研究与开发,1995,7(2):38-43.
- [12] 张景海,王起振,姚恩峰. 应用高效液相色谱法比较我国不同地区东亚钳蝎毒(*Buthus martensii* Karsch) [J]. 沈阳药科大学学报,1995,12(2):96-101.
- [13] 李万忠,何群,严守升. 蝎毒的采集、提取、分离、鉴定研究[J]. 中成药,2004,26(7):574-576.

DOI 10.3870/yydb.2012.09.031