

壁虎仿生酶解产物的凝胶分析系统比较研究

曲颖, 张宁, 王彬, 刘杨, 包华音* (山东中医药大学, 济南 250355)

摘要: 目的 优选适合分离壁虎小分子肽的凝胶分离体系, 为提高壁虎多肽的生物利用度和小分子肽分离分析提供实验依据。方法 采用仿生酶解法体外酶解壁虎蛋白质, 采用福林酚比色法测定仿生酶解前后肽含量的变化, 分别采用 SDS-PAGE 凝胶系统和 Tricine-SDS-PAGE 凝胶系统比较分析仿生酶解前后肽数量及分子量的变化。结果 壁虎经仿生酶解处理后, 小分子肽含量增加, 分子量降低, 且 Tricine-SDS-PAGE 凝胶系统所能分离的条带数量明显多于 SDS-PAGE 凝胶系统。结论 Tricine-SDS-PAGE 电泳三层凝胶系统更适用于分离壁虎小分子肽。

关键词: 壁虎; 仿生酶解; 小分子肽; Tricine-SDS-PAGE 法

中图分类号: R914.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2021)21-2688-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.21.010

引用本文: 曲颖, 张宁, 王彬, 等. 壁虎仿生酶解产物的凝胶分析系统比较研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(21): 2688-2693.

Comparative Study on Gel Analysis System of Biomimetic Enzymatic Hydrolysis Products of Gekko

QU Ying, ZHANG Ning, WANG Bin, LIU Yang, BAO Huayin* (Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To optimize the gel separation system suitable for the separation of gekko small molecular peptides and to provide experimental basis for improving the bioavailability of gekko peptides and the separation and analysis of small molecular peptides. **METHODS** Biomimetic enzymatic hydrolysis was used to hydrolyze gekko protein *in vitro*, and folin-ciocalteu colorimetry was used to determine the changes in peptide content before and after biomimetic enzymatic hydrolysis. SDS-PAGE gel system and Tricine-SDS-PAGE gel system were respectively used to compare and analyze the changes in the number and molecular weight of peptide before and after biomimetic enzymatic hydrolysis. **RESULTS** After the gekko was treated by biomimetic enzymatic hydrolysis, the content of small peptides increased while the molecular weight decreased. Moreover, the number of bands separated by Tricine-SDS-PAGE gel system was significantly more than that of SDS-PAGE gel system. **CONCLUSION** The three-layer gel system of Tricine-SDS-PAGE electrophoresis is more suitable for the separation of gekko small molecular peptides.

KEYWORDS: gekko; biomimetic enzymatic hydrolysis; small molecular peptide; Tricine-SDS-PAGE method

壁虎, 又名守宫、天龙, 药用部位为无蹼壁虎(*Gekko swinhonis*)或其他几种壁虎除去内脏的全体^[1], 性寒, 味咸, 有小毒, 归肝、肾经, 是传统的软坚散结中药, 具有祛风定惊、镇静止痛、散结解毒等功效。壁虎临床上多用于抗肿瘤, 是我国传统的民间抗肿瘤动物药之一^[2]。前期研究发现, 采用独特仿生酶解工艺制得的有效部位天龙小肽抗肿瘤活性更加显著^[3]。由于低分子量肽具有很多优良的理化性质和生理功能, 如许多生理必需的调节因子都是小肽类。同时, 生物技术的发展也促进了大量小分子基因工程肽类药物的出现, 因此, 小分子肽的分离、纯化和鉴定技术日趋重要。

聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)是一种用于分离和解析复杂的蛋白质混合物的通用技术, 也是检测动物药中蛋白质的常用方法之一, 多年来, 一直被用来分离相对分子质量在 15~200 kD 的大分子蛋白质^[4-6], 但其分离小分子蛋白效果较差。国外早有报道的三羟甲基氨基甘氨酸 Tricine-SDS-PAGE 法^[7]可用于分离小分子肽。陶然等^[8]采用 Tricine-SDS-PAGE 电泳法比较全蝎白术白头翁组方在发酵前后水溶性蛋白质相对分子量的变化情况。于丽娜^[9]采用 Tricine-SDS-PAGE 法对梅花鹿鹿茸蛋白多肽深层次的分子量分布情况进行相关研究。可见, 该方法在相关领域应用得越来越广泛。

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2018GSF119013, 2019RKB141116); 山东省高等学校青创科技支持计划项目(2019RWG013)

作者简介: 曲颖, 女, 硕士生 Tel: 17864190877 E-mail: 17864190877@163.com *通信作者: 包华音, 女, 博士, 副教授 Tel: 13225319859 E-mail: baohuayin@163.com

此外,通过查阅相关文献^[10-11]及多次试验,发现在分离胶中添加甘油的确可以改善小分子量短肽的电泳分离效果。本研究采用福林酚比色法分析测定了经过仿生酶解处理前后的多肽含量,并在分离胶中添加甘油处理,对经过仿生酶解处理的壁虎多肽进行了聚丙烯酰胺凝胶电泳比较分析,为壁虎药材生物利用度的提高及其抗肿瘤机制的研究提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

DYY-8C 型稳压稳流电泳仪、DYY-III28 型电泳槽均来自北京六一仪器厂;LGR16-W 型离心机(北京医用离心机厂);Tanon 1600 凝胶成像分析系统(上海天能科技有限公司);KQ2200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HH-6 数显恒温水浴锅(天津市赛得利斯实验分析仪器制造厂);FA2004N 型电子天平、UV-752N 型紫外-可见分光光度计均来自上海精密科学仪器有限公司;pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司)。

1.2 试剂

丙烯酰胺(天津市瑞金特化学品有限公司,批号:20150104);*N-N* 亚甲基双丙烯酰胺(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:20140723);*N*-三(羟甲基)甲基甘氨酸(BioRuler,批号:5704-04-1);三羟甲基氨基甲烷(Tris)(批号:F20090417)、甘氨酸(批号:F20111222)、十二烷基硫酸钠(批号:20140814)、盐酸(批号:20190222)、氢氧化钠(批号:20180308)、酒石酸钾(批号:20151015)、硫酸铜(批号:20140507)均购自国药集团化学试剂有限公司;胃蛋白酶(上海麦克林生化科技有限公司,批号:CAS-9001-75-6);胰蛋白酶(北京兰杰柯科技有限公司,批号:68060300);福林酚(上海源叶生物科技有限公司,批号:S04A9J57776);普通分子量蛋白质 Marker(批号:00726030)、超低分子量蛋白质 Marker(批号:20190418)均购自 Solarbio 公司;水为双蒸水;碳酸钠(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:20061009)。

1.3 药材

壁虎药材购自安徽亳州药材市场,经山东中医药大学中药质量控制与资源研究实验室李峰教授鉴定为无蹼壁虎(*Gekko swinhonis*)。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

2.1.1 样品 1 的制备 取适量无蹼壁虎的干燥全

体,粉碎研磨后,称定 2 g,放入 50 mL 烧杯中,加入 18 mL 的蒸馏水,在 40 °C 下水浴提取 15 min 作为样品 1。

2.1.2 样品 2 的制备 取壁虎粉末 2 g,精密称定,按照“2.1.1”项下方法制备后,继续用稀 HCl 调节 pH 值为 2.0,在 37 °C 下水浴保温 10 min 后加入 0.02 g 胃蛋白酶,在 37 °C 下酶解 2 h,然后加热到 65 °C 将酶灭活作为样品 2。

2.1.3 壁虎小肽的制备 取壁虎粉末 2 g,精密称定,按照“2.1.2”项下方法制备后,然后用 NaOH 调节 pH 值为 8.0,在 50 °C 下水浴保温 10 min 后加入 0.02 g 胰蛋白酶,在 50 °C 下酶解 3 h,然后加热到 65 °C 将酶灭活作为样品 3。

3 份样品均冷却至室温后,在 4 000 r·min⁻¹ 下离心 10 min,取上清液,在沉淀中加入适量的蒸馏水使之混悬后,在 4 000 r·min⁻¹ 下离心 5 min,合并 2 次离心得到的上清液,并进行浓缩,过滤后备用。

2.2 福林酚比色法测定总肽含量^[12]

2.2.1 溶液的配制 配制碱性铜试液(临用现配),取氢氧化钠 10 g,碳酸钠 50 g,加水 400 mL 使溶解,作为甲液;取酒石酸钾 0.5 g,加水 50 mL 使溶解,另取硫酸铜 0.25 g,加水 30 mL 使溶解,将两液混合作为乙液。临用前,合并甲乙液,并加水稀释至 500 mL,备用。

2.2.2 标准曲线的绘制 精密量取对照品溶液 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL,分别置具塞试管中,分别加水至 1.0 mL,再分别加入碱性铜试液 5.0 mL,混匀,分别加入福林试液 0.5 mL,立即混匀,置 55 °C 水浴中平行反应 5 min,取出,置冷水浴中冷却 10 min,用紫外-可见分光光度计于 650 nm 波长处迅速测定吸光度。以吸光度为纵坐标(*Y*),牛血清白蛋白含量为横坐标(*X*, mg),绘制标准曲线。经计算得线性回归方程: $Y=2.316X+0.0056$, $r=0.9994(n=6)$ 。

2.2.3 供试品测定法 精密量取供试品溶液 1.0 mL,按照“2.2.2”项下方法,测定供试品的吸光度,代入回归方程中计算总肽的含量。

研究结果表明:壁虎酶解前肽浓度为 0.574 mg·mL⁻¹,经过仿生酶解处理后,总肽浓度为 0.830 mg·mL⁻¹,约为酶解前肽含量的 1.5 倍,总肽含量明显增高。

2.3 多肽电泳分析与分子量测定

2.3.1 配胶 安装好电泳槽,按照表 1 数据分别

配制浓缩胶浓度为 4%，夹层胶浓度为 10%，分离胶浓度为 16.5% 的 3 层不连续 Tricine-SDS-PAGE 凝胶系统，以及浓缩胶浓度为 4%，分离胶浓度为 16.5% 的 2 层不连续 SDS-PAGE 凝胶系统。凝胶现用现配，最后加入 10% 过硫酸铵和 TEMED，防止凝胶在灌胶前过快凝固。

表 1 浓缩胶、间隙胶、分离胶的组成

Tab. 1 Composition of concentrated gum, gap gum and separating gum

项目	浓缩胶	间隙胶	分离胶
0.495T, 3% 贮液/ μL	500	1 000	6 700
凝胶缓冲液/ μL	1 550	1 675	6 700
10% 过硫酸铵/ μL	50	50	200
TEMED/ μL	5	5	10
蒸馏水/ μL	4 125	2 300	6 500
最终体积/ μL	6 230	5 000	20 000

2.3.2 灌胶 按照分离胶在下，浓缩胶在上的顺序迅速灌胶。

2.3.3 上样 向浓缩胶上样孔中分别加入标准分子量蛋白质(Marker)、样品 1、样品 2、样品 3、超低分子量蛋白质(Marker)各 30 μL 。

2.3.4 电泳 上样完成后，将电极缓冲液倒入电泳槽中，加入适量溴酚蓝指示剂示踪，接通电源。电泳开始时，设置恒定电流 18 mA，样品进入分离胶后调整恒定电流为 28 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 6 h，为保证有效散热，电泳在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内进行。

2.3.5 固定与染色 电泳结束后，轻取分离胶，放入染色液中染色 1 h 左右。

2.3.6 脱色 倾去染色液，经常更换脱色液，直至谱带背景清晰为止。

壁虎蛋白质经胃蛋白酶分解为多肽后的谱带数目增加，经 SDS-PAGE 2 层凝胶系统电泳得到 12 条谱带，在凝胶系统中分散较为均匀，经 Tricine-SDS-PAGE 3 层系统得到 16 条谱带则较为集中，多分布在分子量为 35~100 kD 的电泳条带之间。而后经胰蛋白酶继续酶解成壁虎小肽，分子量明显减小，经 SDS-PAGE 2 层不连续凝胶系统，壁虎小肽仅电泳出 8 条分辨率较清晰的谱带，而利用 Tricine-SDS-PAGE 3 层不连续系统则得到 10 条分辨率较高的电泳条带，而且皆是分子量 < 55 kD 的肽分子。结果见图 1 和表 2。

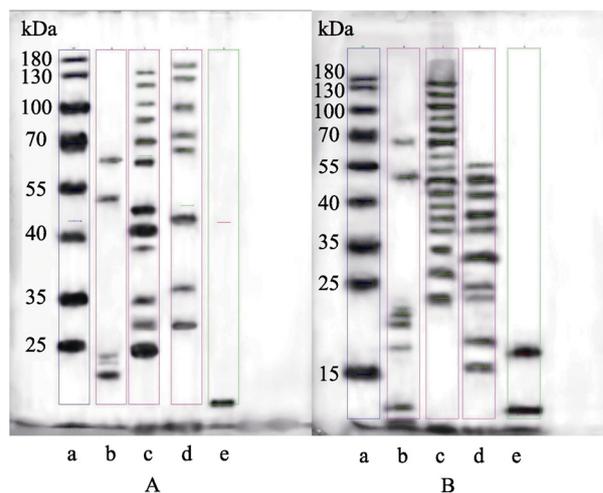


图 1 壁虎仿生酶解前后电泳条带图

A-SDS-PAGE 电泳条带图；B-Tricine-SDS-PAGE 电泳条带图；a-普通分子量 Marker；b-样品 1；c-样品 2；d-壁虎小肽；e-超低分子量 Marker。

Fig. 1 Electrophoretic band map of Gekko before and after biomimetic enzymatic hydrolysis

A-SDS-PAGE electrophoresis strip diagram; B-Tricine-SDS-PAGE electrophoresis strip diagram; a-common molecular weight Marker; b-sample 1; c-sample 2; d-Gekko small peptide; e-ultra-low molecular weight Marker.

表 2 壁虎多肽经不同电泳系统电泳后谱带数量

Tab. 2 Number of bands of Gekko polypeptide after electrophoresis with different electrophoresis systems

分子量/ kD	样品 1		样品 2		壁虎小肽	
	A	B	A	B	A	B
<15	—	2	—	—	—	—
15~25	3	4	1	1	—	4
25~35	—	—	2	2	1	1
35~40	—	—	1	3	1	2
40~55	1	1	2	3	1	3
55~70	1	1	1	2	1	—
70~100	—	—	2	2	2	—
100~130	—	—	2	2	1	—
130~180	—	—	1	1	1	—
总计	5	8	12	16	8	10

注：A-SDS-PAGE 电泳条带图；B-Tricine-SDS-PAGE 电泳条带图。

Note: A-SDS-PAGE electrophoresis strip diagram; B-Tricine-SDS-PAGE electrophoresis strip diagram.

图 2~3 为电泳条带经过凝胶成像仪分析后的结果，与图 1 各个样品自上而下的电泳条带相对应，横坐标为每个条带的迁移率，纵坐标为强度，清晰比较不同电泳方法以及不同样品之间的差异。样品 1 为壁虎蛋白质，未经过仿生酶解处理，分子量较大，显然电泳条带较少且迁移较为分散。样品 2 为壁虎大分子蛋白质经过胃蛋白酶初步酶解，分解为多肽，电泳条带数量明显增加且迁移

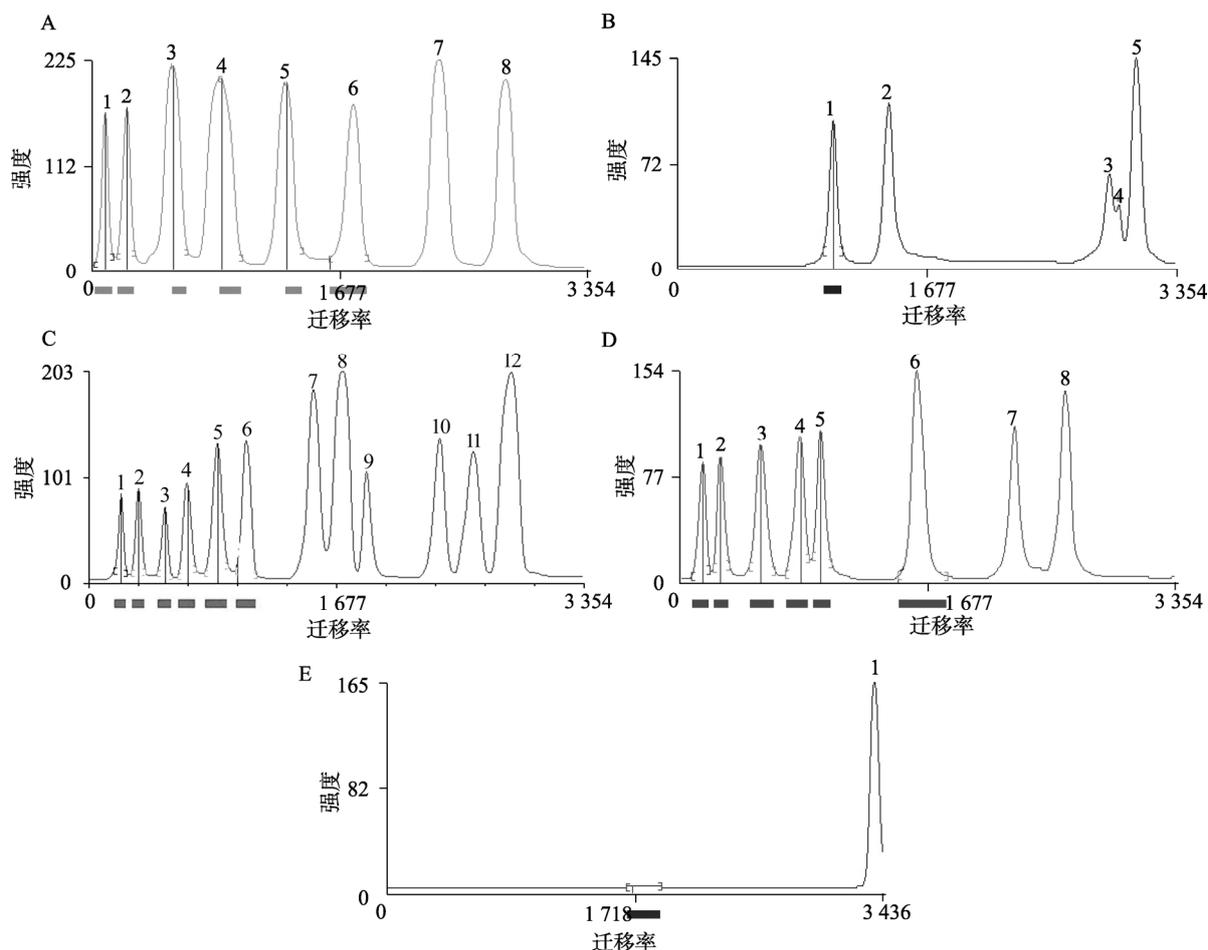


图2 SDS-PAGE 电泳条带凝胶成像仪分析

A-普通分子量 Marker; B-样品 1; C-样品 2; D-壁虎小肽; E-超低分子量 Marker。

Fig. 2 Analysis of SDS-PAGE electrophoresis strip by gel imager

A-normal molecular weight Marker; B-sample 1; C-sample 2; D-Gecko small peptides; E-ultra-low molecular weight Marker.

较为集中。壁虎小肽为壁虎蛋白质经过胃蛋白酶处理后，再经胰蛋白酶处理，酶解完全，分子量降低。可知不同处理方法所得到的壁虎多肽具有明显差异，胃蛋白酶只是将壁虎蛋白质初步分解为多肽，最后经胰蛋白酶酶解才能得到壁虎小肽。

由以上结果可见，仿生酶解处理后，将大分子壁虎蛋白质酶解成了小分子的壁虎小肽，且对于每个样品，Tricine-SDS-PAGE 3 层不连续凝胶系统电泳所得到的条带数量皆明显高于 SDS-PAGE 2 层不连续凝胶系统，对于壁虎小肽的分离效果更好。

3 讨论

近年来，壁虎多肽的抗肿瘤效果逐渐被学术界重视，吕行直等^[13]运用流式细胞仪和蛋白免疫印迹法研究壁虎活性多肽对人食管癌 Ec 9706 细胞的增殖与凋亡的影响。尹慧萍^[14]研究发现壁虎粗多肽对人神经母细胞瘤细胞的增殖、迁移具有抑制作用，可诱导凋亡。但壁虎大分子蛋白质的

抗肿瘤疗效远不如小分子多肽。前期研究发现，中药壁虎在酶解后抗肿瘤活性会显著提高。经过蝉拟青霉发酵后菌质粗提物中的蛋白质含量减少，体外抗 HepG2 肿瘤细胞增殖活性增加^[15-16]。本研究运用体外仿生酶解法将壁虎中大分子蛋白质转换成小分子多肽，将更易被患者吸收，对壁虎临床抗肿瘤作用的发挥具有积极意义。本研究仿生酶解过程中需精确控制温度，在 37 °C 水浴保温下使大分子蛋白质酶解完全，防止蛋白质在酶解过程中变性。

福林酚比色法的反应原理为蛋白质或多肽含有的肽键结构在碱性条件下，与铜试剂中的 Cu^{2+} 反应，生成蛋白质(多肽)-铜复合物，该复合物中的芳香族氨基酸残基可还原酚试剂中的磷钼酸盐和磷钨酸盐，生成深蓝色的化合物，溶液颜色的深浅在一定范围内与蛋白质或多肽含量呈正相关^[17]。因为福林酚试剂只在酸性条件下稳定，而

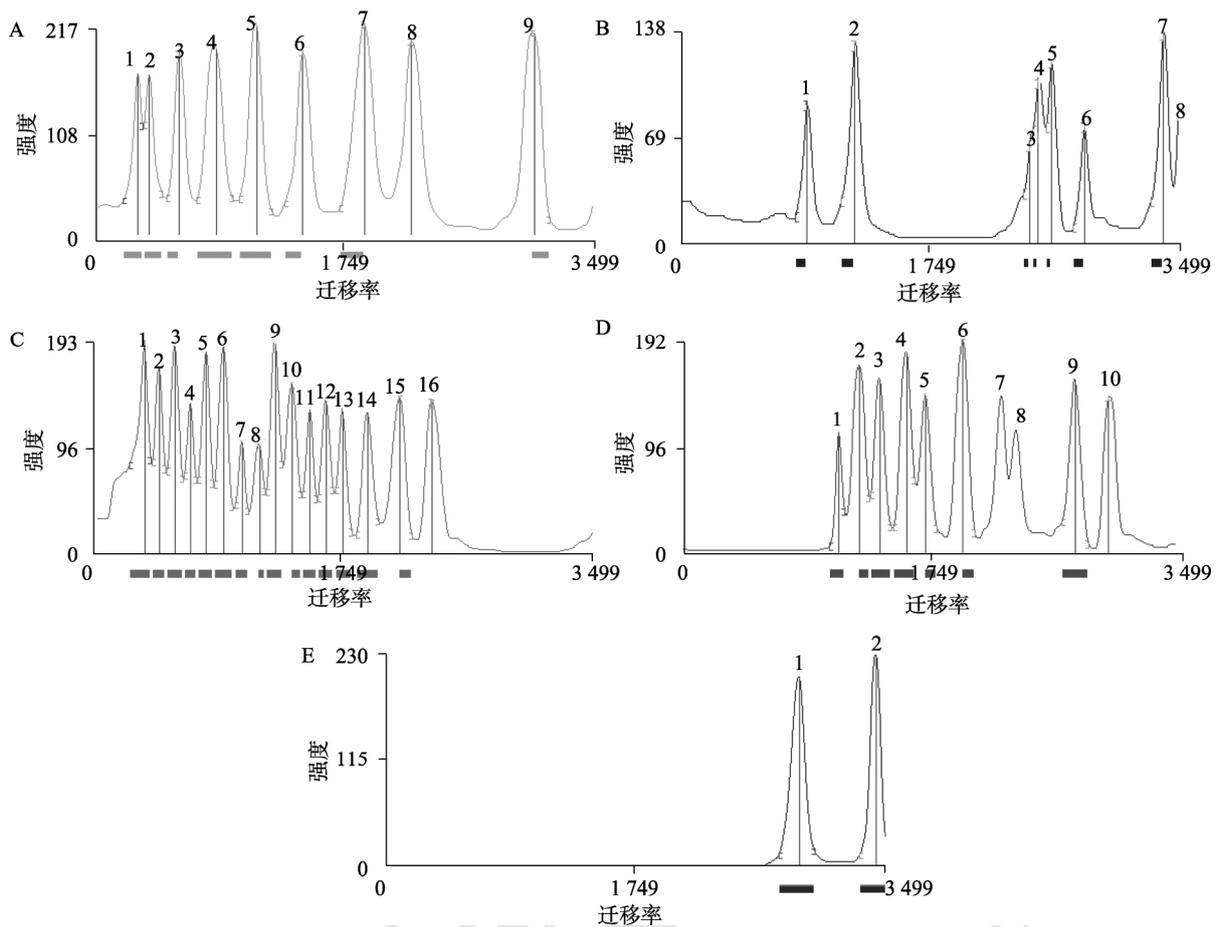


图3 Tricine-SDS-PAGE 电泳条带凝胶成像仪分析

A-普通分子量 Marker; B-样品 1; C-样品 2; D-壁虎小肽; E-超低分子量 Marker。

Fig. 3 Analysis of Tricine-SDS-PAGE electrophoresis strip by gel imager

A-normal molecular weight Marker; B-sample 1; C-sample 2; D-Gecko small peptides; E-ultra-low molecular weight Marker.

显色反应在碱性条件下进行, 所以加入福林酚试剂后应立刻充分混匀, 否则显色能力会下降。

Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳是小分子蛋白质分析的常用方法^[18], 高世杰等^[19]运用 3 层凝胶电泳系统有效提高了全蝎蛋白的分离效果。本研究借助 Tricine-SDS-PAGE 凝胶电泳体系分离壁虎小肽, 优选适合分离壁虎小肽的凝胶系统。从研究结果可以看出, 3 层不连续凝胶系统可以有效分离出分子量较小的壁虎小肽, 并提高电泳谱带的分辨率。但该多肽混合物在分离胶、夹层胶和浓缩胶中仍存在不同程度的聚集现象, 是否可以通过改变 3 层胶高度的比例或者其他方法消除这一现象有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] ZHANG Y T. Study on the quality of gecko swinhonis Gunther[J]. Asia-Pac Tradit Med(亚太传统医药), 2017, 13(18): 25-27.
- [2] WANG A H, ZHANG N, TIAN Y Q, et al. Screening active

fractions of Gekko against BEL-7402 cells *in vitro*[J]. Shandong J Tradit Chin Med(山东中医杂志), 2019, 38(10): 978-981, 989.

- [3] 李钦青, 孙明江, 代龙, 等. 壁虎不同提取工艺成分抗肿瘤作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7): 1629-1630.
- [4] ZHU Y F, CHU Z Y, LI H J. Study of the different kinds of pilose antler protein differentiation by SDS-PAGE gel[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报), 2017, 19(6): 48-51.
- [5] JIANG L F, QIAN Z G, YANG H L, et al. Improvement on gel electrophoresis method for separating small molecule polypeptide[J]. Chem World(化学世界), 2007, 48(4): 200-202.
- [6] KUMAR G. Principle and method of silver staining of proteins separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis[J]. Methods Mol Biol, 2018(1853): 231-236.
- [7] SCHÄGGER H, VON JAGOW G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa[J]. Anal Biochem, 1987, 166(2): 368-379.
- [8] TAO R, LIU F J, WANG Y L, et al. Analysis on molecular weight of soluble protein of SAPZF before and after fermentation[J]. Contemp Chem Ind(当代化工), 2020, 49(7):

- 1330-1332.
- [9] 于丽娜. 梅花鹿鹿茸蛋白多肽的提取工艺及其性质研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2019.
- [10] 周伟, 易荣大, 彭文, 等. TricineSDSPAGE 分析抑肽酶相对分子质量的方法初探[J]. 天津药学, 2015, 27: 11-13.
- [11] CHEN Y K, WANG X G, WANG Y P. Analysis of the molecular weight of peptides in thymosin by tricine-SDS-PAGE[J]. J Mod Lab Med(现代检验医学杂志), 2016(1): 132-133, 137.
- [12] MA R, LIU Y J, WEI Y L, et al. Study on optimum degreasing process for active composition of gecko by bionic enzymatic hydrolysis[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(13): 1608-1611.
- [13] LÜ X Z, LI R F, LI Z J, et al. Effect of gecko active polypeptide on the proliferation and apoptosis of human esophageal carcinoma 9706 cells inducing by mitochondria pathway[J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2019, 35(6): 543-546.
- [14] YIN H P. The effect and mechanism of gecko crude peptides on SH-SY₅Y cells[D]. Luoyang: Henan University of Science and Technology, 2020.
- [15] YANG F, ZHAO C Y, QU Q S, et al. Study on antitumor effect of crude extract of Gekko swinhonis/paecilomyces cicadae[J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2019, 21(12): 1616-1619.
- [16] SUN Y R, WANG C M, XIE X Q, et al. Anti-tumor effect of 3 gecko hydrolysates on H22 transplanted tumor in mice and Bel7402 cells[J]. Central South Pharm(中南药学), 2020, 18(7): 1132-1136.
- [17] WEI G, BIAN H X, XI M M, et al. Determination of polypeptide in Youmijia Capsules by Folin-phenol colorimetry[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2016, 38(1): 91-93.
- [18] HAIDER S R, REID H J, SHARP B L. Tricine-SDS-PAGE[J]. Methods Mol Biol, 2019(1855): 151-160.
- [19] 高世杰, 冯玉, 王集会. 全蝎可溶性蛋白质 TRICINE-SDS-PAGE 电泳法分离研究[J]. 山东中医杂志, 2013, 32(3): 196-197.

收稿日期: 2020-10-26
(本文责编: 沈倩)