·基础研究·

采用聚丙烯酰氨凝胶电泳技术鉴别龟甲及其混伪品△

徐清[1]，李梦[2]，罗雪梅[1]，孟杰亲[1]，张帆[1]，陈秀芬[1]，刘春生[1]，杨瑶珺[1*]
1. 北京中医药大学 中药学院，北京　102488；2. 中国中医科学院 中药资源中心，北京　100700

［摘要］ **目的**：从蛋白水平上对龟甲药材及其混伪品进行鉴别，分析龟甲及其混伪品的差异。**方法**：本研究采用聚丙烯酰氨凝胶电泳（SDS-PAGE）技术对龟甲及其混伪品进行鉴别，并对龟甲的背甲与腹甲、不同批次正品龟甲药材进行对比分析。**结果**：对于同一品种的龟甲，其背甲与腹甲的蛋白质亚基相似，电泳得到的蛋白质条带几乎无明显差别；不同批次正品龟甲在一维电泳中显现出的蛋白亚基条带差异性很小，其电泳蛋白条带受产地、批次等因素影响较小；正品龟甲在 14～19 kDa，有 3 条高丰度蛋白聚合在一起，这“二细一粗三聚合”的条带群，可以作为鉴别正品龟甲和其他龟甲混伪品的初步依据。**结论**：结果显示，SDS-PAGE 电泳技术可以对龟甲及其混伪品药材进行初步的鉴别，利用蛋白条带的区别可对其进行区分。

［关键词］ 龟甲；混伪品；聚丙烯酰氨凝胶电泳；蛋白
［中图分类号］ R282.74；R284；R282.5　［文献标识码］ A　［文章编号］ 1673-4890（2019）09-1251-05
doi：10.13313/j.issn.1673-4890.20190214013

Identification of Tortoise Shells and Counterfeit Products by Polyacrylamide Gel Electrophoresis（SDS-PAGE）

XU Qing[1]，LI Meng[2]，LOU Xue-mei[1]，MENG Jie-qin,[1]，ZHANG Fan[1]，CHEN Xiu-fen[1]，
LIU Chun-sheng[1]，YANG Yao-jun[1*]
1. *Beijing University of Chinese Medicine*，*School of Traditional Chinese Materia Medica*，*Beijing* 102488，*China*；
2. *China Academy of Chinese Medical Sciences*，*Traditional Chinese Medicine Resource Center*，*Beijing* 100700，*China*

［**Abstract**］ **Objective**：To identify tortoise shell and its adulterants at the protein level，and analyze the differences between tortoise shell and its adulterants. **Methods**：In this study，polyacrylamide gel electrophoresis（SDS-PAGE）was used to identify tortoise shells and their mixed products. The tortoise shells and plastrons and different batches of authentic tortoise shell were compared. **Results**：For the same species of tortoise shell，the protein subunit of dorsal and abdominal shells are similar，and there was almost no significant difference in the protein bands obtained by electrophoresis. The protein subunits of different batches of genuine tortoise shell showed little difference in one-dimensional electrophoresis，and the electrophoretic protein bands were less affected by factors such as origin and batch. There were three high abundance proteins aggregated between 14 and 19 kDa. The band group of "two fine and one rough trimerization" can be used as a preliminary basis for identifying genuine tortoise shells and other adulterated tortoise shells. **Conclusion**：The results show that SDS-PAGE electrophoresis can be used to identify the tortoiseshell and its mixed counterfeit medicinal materials，and distinguish them by the difference of protein bands.

［**Keywords**］ tortoise shell；adulterant；SDS-PAGE；protein

龟甲为龟科动物乌龟 *Chinemys reevesii*（Gray）的背甲及腹甲，具有滋阴潜阳、益肾强骨、养血补心、固精止汗的作用，用于阴虚潮热、骨蒸盗汗、头晕目弦、虚风内动、筋骨痿软、心虚健忘、崩漏经多等症[1]。

龟甲及其混伪品药材在活体动物上的鉴别有很

△［基金项目］ 国家中医药管理局 2015 年度中医药行业科研专项（2015468002-2）；北京中医药大学在读研究生自主项目（2018-JYB-XS074）
*［通信作者］ 杨瑶珺，教授，研究方向：中药品种及质量鉴定；E-mail：yangyaoj002@sina.com

强的鉴别特性，易于区分，但在处理成龟甲药材时或在处理成粉末时，带有鉴别特征的龟甲条纹外层部分易脱落，增加了性状鉴别的难度[2-4]。2015 版《中华人民共和国药典》中规定的龟甲鉴别方法为薄层色谱法，通过查阅相关文献[5-7]及前期实验，发现薄层色谱法对不同品种龟甲的鉴别有一定局限性，高效液相色谱法分析时间较长且操作较复杂，故笔者采用 SDS-PAGE 电泳技术对龟甲及其混伪品的蛋白质条带进行初步鉴别，从蛋白水平上对其进行鉴别研究。

1　材料

1.1 样品

样品为来自表 1 中不同产地及批次的共 53 批龟甲及混伪品药材，其中 35 批龟甲为正品龟甲，经北京中医药大学杨瑶珺教授鉴定，均为龟科动物乌龟 *Chinemys reevesii*(Gray)的背甲及腹甲。

1.2 仪器

电泳仪(型号 AE-8135，ATTO 公司)；电泳槽(型号 Tetra System，Bio-Rad)；玻璃板(长板/短板，Bio-Rad)；灌胶架(型号 1653304，Bio-Rad)；加样梳［10 孔(1 mm)(Bio-Rad)］；超声清洗器(型号 KQ5200E，昆山市超声仪器有限公司)；冷冻离心机(3K-15 低温高速离心机，SIGMA 公司)；脱色摇床(型号 TS-1，其林贝尔仪器销售公司)；玻璃培养皿(型号 100 mm，北京高华伟业食品添加剂有限公司)。

1.3 试剂

蒸馏水(规格 4.5 L，广州屈臣氏食品饮料有限公司)；SDS(规格 100 g，北京博迈德科技发展有限公司)；三羟甲基氨基甲烷(规格 500 g，北京化工厂)；盐酸(规格 100 mL，北京化工厂)；丙烯酰胺(规格 100 g，北京化工厂)；甘氨酸(规格 500 g，北京化工厂)；蔗糖(规格 500 g，北京化工厂)；考马斯亮蓝 G250(规格 25 g，北京化工厂)；蛋白 Marker(规格 20 次，北京拜尔迪生物技术有限公司)；四甲基乙二胺(规格 50 mL，北京拜尔迪生物技术有限公司)；4×样品缓冲液(规格 5 mL，北京拜尔迪生物技术有限公司)；Ripa 裂解液(规格 50 mL，北京拜尔迪生物技术有限公司)；胰蛋白酶(规格 1 g，北京拜尔迪生物技术有限公司)。

表 1　龟甲样品信息

序号	样品号	样品名称	采集地
1	1a	乌龟上甲	广东东莞
2	1b	乌龟下甲	广东东莞
3	2a	巴西龟上甲	江苏苏州
4	2b	巴西龟下甲	江苏苏州
5	3a	黄喉拟水龟上甲	江苏无锡
6	3b	黄喉拟水龟下甲	江苏无锡
7	4a	乌龟上甲	江苏扬州
8	4b	乌龟下甲	江苏扬州
9	5a	巴西龟上甲	浙江杭州
10	5b	巴西龟下甲	浙江杭州
11	6a	安布闭壳龟上甲	浙江杭州
12	6b	安布闭壳龟下甲	浙江杭州
13	7a	缅甸陆龟上甲	广东广州
14	7b	缅甸陆龟下甲	广东广州
15	8a	锯缘摄龟上甲	广东广州
16	8b	锯缘摄龟下甲	广东广州
17	9	小鳄龟甲	广东电白
18	10	大鳄龟甲	江苏南京
19	11a	中华花龟上甲	广东东莞
20	11b	中华花龟下甲	广东东莞
21	12a	地龟上甲	广东广州
22	12b	地龟下甲	广东广州
23	13a	平胸龟上甲	浙江杭州
24	13b	平胸龟下甲	浙江杭州
25	14a	齿缘摄龟上甲	广东广州
26	14b	齿缘摄龟下甲	广东广州
27	15a	乌龟上甲	广东广州
28	15b	乌龟下甲	广东广州
29	16a	乌龟上甲	广东广州
30	16b	乌龟下甲	广东广州
31	17a	乌龟上甲	广东电白
32	17b	乌龟下甲	广东电白
33	18a	乌龟上甲	江苏南京
34	18b	乌龟下甲	江苏南京
35	19a	乌龟上甲	江苏无锡
36	19b	乌龟下甲	江苏无锡
37	20a	乌龟上甲	浙江杭州
38	20b	乌龟下甲	浙江杭州
39	21a	乌龟上甲	北京
40	21b	乌龟下甲	北京
41	22a	乌龟上甲	北京
42	22b	乌龟下甲	北京
43	23a	乌龟上甲	北京
44	23b	乌龟下甲	北京
45	24	全甲样品	河北安国
46	25	全甲样品	河北安国
47	26	全甲样品	安徽亳州
48	27	全甲样品	安徽亳州
49	28	全甲样品	安徽亳州
50	29	乌龟下甲	河北安国
51	30	乌龟下甲	河北安国
52	31	乌龟下甲	安徽亳州
53	32	乌龟下甲	安徽亳州

2　方法

2.1 样品制备

取研磨后的正品龟甲细粉样品，用液氮再次研细，精密称取 20 mg，加入 4 × 蛋白质 Loading Buffer 100 μL，双蒸水 300 μL，将其稀释成 1 × 的缓冲液，100 ℃水浴 10 ~ 20 min，冷却后，用冷冻离心机 14 000 r·min^{-1}离心 10 min，取上清液至 1.5 mL 离心管中，存放至 4 ℃环境备用。

2.2 胶板制备

2.2.1 分离胶(12%)和浓缩胶(5%)的配制　按表 2 配制十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)，过硫酸铵(APS)和四甲基乙二胺(TEMED)(需要在最后向制胶器中倒入凝胶前再加)，加的时候要迅速，防止胶提前凝固。所需试剂及具体用量见表 2。

表 2　SDS-PAGE 配制所需试剂

mL

凝胶浓度	12% 分离胶	5% 浓缩胶
蒸馏水	1.60	1.40
30% 丙烯酰胺溶液	1.75	0.33
1.5 mmol·L^{-1} Tris-HCl(pH 8.8)	1.30	—
1.0 mmol·L^{-1} Tris-HCl(pH 6.8)	—	0.25
10% SDS	0.05	0.02
10% APS(倒胶前加)	0.10	0.02
TEMED(倒胶前加)	0.01	0.02
凝胶总体积	5.00	2.00

注：—表示不添加试剂。

2.2.2 胶板的制备　用蒸馏水将玻璃板冲洗干净并晾干。按照装置的说明书组装好制胶器，用水检测是否漏水。吸取配好的 12% 离胶，注入两玻璃板之间至约占整个板的四分之三的高度。待分离胶凝固好，倒净两块玻璃板中剩余的液体，注满 5% 的浓缩胶，插入梳子，放置 2 h 以上。待浓缩胶完全凝固后缓慢拔出梳子，用电泳缓冲液填满点样孔准备点样。

2.2.3 SDS-PAGE 电泳　将离心得到的上清样品与 4 × Protein Loading buffer 按照 3∶1 的比例充分混匀。涡旋混匀后，沸水浴 15 ~ 20 min 使蛋白变性，沸水浴之后立即放置冰上冷却 2 min，再用 14 000 r·min^{-1}离心 2 min。将离心之后的上清液进行点样(10 μL)，先用 80 V 的电压使蛋白条带跑过浓缩胶，再调整电压至 120 V，待蛋白条带跑到玻璃板底部即可停止跑胶。

2.2.4 胶板的染色与脱色　将胶小心地从玻璃板中取出，用考马斯亮蓝染色液染色，振荡过夜。倒出染色液，将胶放入脱色液中，多次振荡脱色，直到蛋白条带清晰，蓝色背景脱掉为止。将凝胶拍照并保存。

3　结果

3.1 龟甲背甲及腹甲药材的 SDS-PAGE

通过对不同品种龟甲背甲与腹甲的 SDS-PAGE 电泳实验发现，对于同一品种的龟甲，其背甲与腹甲的蛋白质亚基相似，电泳得到的蛋白质条带几乎无明显差别，难以通过一维电泳方法对龟甲的背甲与腹甲进行区分。在本实验中其蛋白质亚基几乎没有区别，以至于蛋白条带几乎相同，同时也意味着在后续本实验中无需将龟甲背甲与腹甲分开进行讨论。

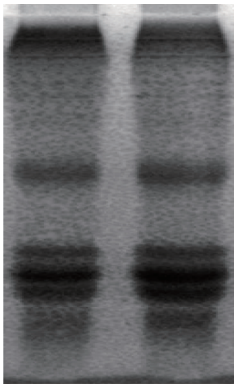


图 1　2a2b 对比图

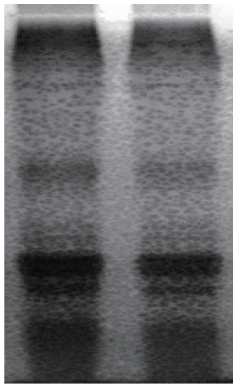


图 2　3a3b 对比图

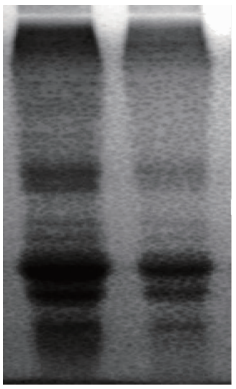


图 3　4a4b 对比图

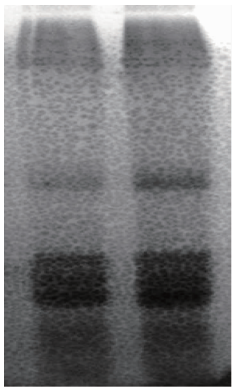


图 4　5a5b 对比图

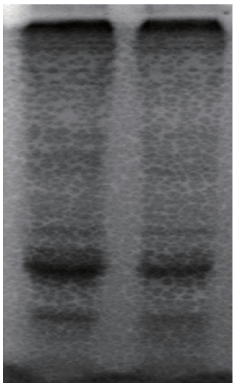


图 5　6a6b 对比图

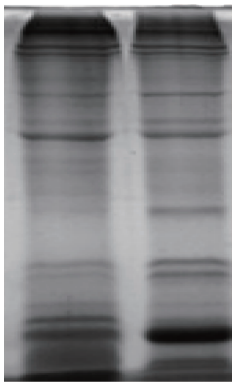


图 6　13a13b 对比图

3.2 不同批次正品龟甲的 SDS-PAGE

通过得到的电泳图发现(见图 7 ~ 8)，该 20 批正品龟甲药材分离得到的蛋白亚基几乎相同，即正品龟甲在一维电泳中显现出的蛋白亚基条带差异性很小，其得到的蛋白条带及蛋白分离情况不易受产地、批次等因素影响，同时也可看出龟甲的一维电泳实验有较强的稳定性与重现性。

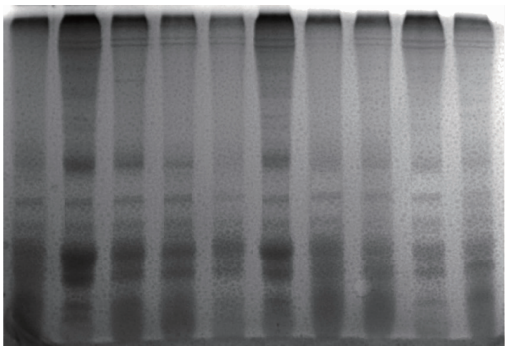


图 7　1 ~ 10 批正品龟甲电泳胶图

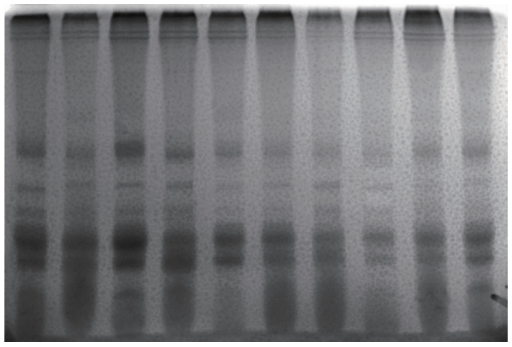
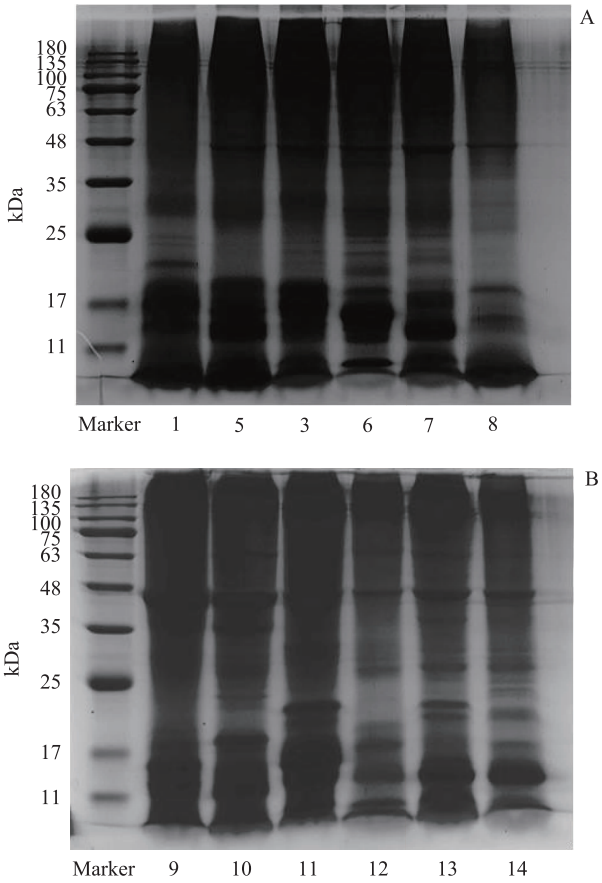


图 8　11 ~ 20 批正品龟甲电泳胶图

3.3 正品及伪品龟甲药材的 SDS-PAGE

结果见图 9。

通过比较分析图 9，可以看出各品种龟甲的蛋白条带各有差异，蛋白亚基的分子质量均在 10 ~ 200 kDa。在 63 ~ 180 kDa，12 个品种的龟甲蛋白质条带相似，无明显区别；在 15 ~ 63 kDa，各品种的龟甲蛋白质条带有明显区别；在 11 ~ 15 kDa 以及 11 kDa 以下，各品种的龟甲几乎无明显蛋白条带，难以进行区分。故可以推测各品种龟甲分离出的蛋白在 63 kDa 以上的大分子量范围内很相似，可能有很多共同蛋白。若想计算某一蛋白条带的蛋白分子量，对蛋白 Marker 条带进行迁移率的计算并与对应的蛋白分子量做标准曲线，得到方程即可知道未知条带的蛋白分子量。



注：1. 为正品；5、3、6 ~ 14. 为伪品。

图 9　正品及混伪品龟甲电泳胶图

正品龟甲(样品 1)除遵守上述规律外，还可以观察到在 42 kDa 蛋白分子量附近，有明显的蛋白条带，以及在 25 kDa 附近，有两条很细的颜色稍浅的蛋白条带且几乎连在一起，在 21 kDa 附近，有一条较粗的颜色稍深的蛋白条带，在 14 ~ 19 kDa，有 3 条高丰度蛋白聚合在一起，这“二细一粗三聚合”的条带群，可以初步作为鉴别正品龟甲和其他龟甲混伪品的依据，因为通过上述多次平行及对比实验，发现正品龟甲的蛋白条带均能满足这一特点，故将这部分蛋白条带与其他品种的龟甲进行区分。

为了更好地观察各品种龟甲的蛋白条带，对所得胶图蛋白条带尤其是差异明显的 15 ~ 63 kDa 部分进行条带归类分析，有条带记为 1，无条带记为 0，以 Marker 及特征明显的蛋白分子量为准来观察各品种龟甲在不同位置下是否也有同等分子量的蛋白条带，具体信息见表 3。

对比电泳胶图及归类整理后的蛋白条带归类表，可以发现蛋白分子量在 63 kDa 以上时无法将各品种

表 3　样品蛋白条带有无情况

样品	135 kDa	130 kDa	63 kDa	48 kDa	42 kDa	38 kDa	35 kDa	32 kDa	30 kDa	28 kDa	25 kDa	24 kDa	23 kDa	22 kDa	21 kDa	19 kDa	18 kDa	17 kDa	16 kDa	14 kDa
1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1
5	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
3	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1
8	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
10	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
11	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
12	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
13	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
14	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1

龟甲鉴别开，且在 135、130、65 kDa 等蛋白分子量位置上，各品种龟甲均有相同条带。对上述数据进行聚类分析，通过得到的聚类树状图可以对上述 12 品种的龟甲蛋白条带信息进行进一步分析，从而更好地对龟甲及其混伪品进行鉴别。分析见图 10。

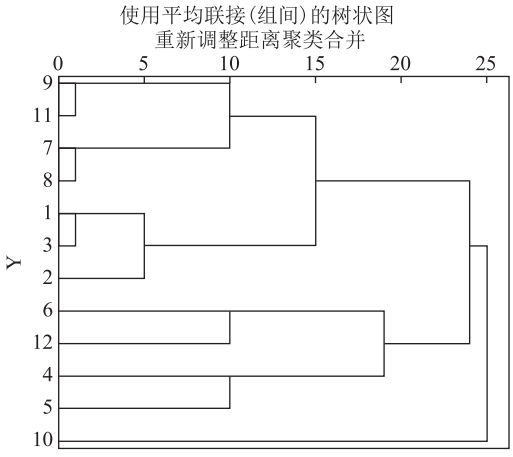


图 10　龟甲及其混伪品药材蛋白条带聚类图

聚类分析结果：以不同品种龟甲蛋白条带谱的相似系数为距离，采用系统聚类法对以上数据进行聚类，得到的结果与胶图的蛋白条带以及对蛋白条带的分析结果均相似，根据各品种(系)间遗传距离的远近来统计分析，同一组内各品种(系)间遗传距离较近，不同组间各品种(系)遗传距离较远。故样品 9、11 为一组，7、8 为一组，1、3 为一组，这 3 组样品的相似性较高，其次样品 6、12 为一组，4、5 为一组，这两组样品的相似性较差。

4　讨论

对采集的不同产地及批次的多批正品龟甲药材进行电泳实验，发现其分离得到的蛋白条带几乎相同，蛋白亚基条带差异性很小，即同一品种的龟甲其蛋白分离得到的条带难以受产地、批次等因素影响，有较强的稳定性和重现性。

对聚类结果进行观察，发现分到同一组的样品可能由于种属比较近似，如 1 号样品乌龟为龟科水龟属，3 号样品黄喉拟水龟为龟科拟水龟属；7 号样品小鳄龟与 8 号样品大鳄龟均为鳄龟科鳄龟属，可能其相似性较多以至于电泳的条带比较相似，因此将电泳得到的龟甲的蛋白条带谱特征部分作为不同品种龟甲分类的补充依据的同时，要注意是否存在电泳条带相似的黄喉拟水龟龟甲药材。

参考文献

[1]　国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版,2015:180-181.

[2]　朱照祥. 龟鳖类甲壳的性状特征鉴别[J]. 中国药业,2003,12(6):57-59.

[3]　刘晓帆,刘春生,杨瑶珺,等. 基于 COI 基因的龟甲及其混伪品的 DNA 条形码研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(7):947-950.

[4]　顾迎寒. 龟甲的生药学研究[D]. 成都:成都中医药大学,2007.

[5]　谢平,杨梅香. 龟上、下甲化学成分比较[J]. 中成药研究,1986(3):32.

[6]　王新雨,谭晓梅,陈飞龙,等. HPLC-ELSD 法测定醋龟甲中羟脯氨酸[J]. 中草药,2011,42(7):1338-1340.

[7]　骆达,李惠芬,李秀兰,等. 异硫氰酸苯酯衍生化-HPLC 法测定龟甲中胶原蛋白[J]. 中草药,2008,39(6):851-852.

(收稿日期:2019-02-14　　编辑:王笑辉)