

塞隆骨与虎骨的骨胶蛋白对比分析

张晓峰 胡伯林 张宝琛

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁, 810001)

摘 要

本文对塞隆骨与虎骨的水煎液的骨胶蛋白进行了初步酒精沉淀、葡聚糖凝胶色谱和透析等技术分离、纯化,再用体积排阻色谱方法,确定塞隆骨与虎骨的骨蛋白 A 部位分子量范围为 12.5 万左右。骨蛋白 B 部位为一混合物,其中 B₁ 分子量范围为 1.2 万左右, B₂ 为一多肽化合物。塞隆骨与虎骨的骨胶蛋白组成、含量无明显差异,为塞隆骨作为虎骨代用品提供了科学理论及实践依据。

关键词: 体积排阻色谱; 塞隆骨; 虎骨; 骨胶蛋白

塞隆 (*Myospalax baileyi*) 骨为仓鼠科动物高原鼯鼠的干燥全骨架。塞隆骨有与虎骨相似的性味及功能 (叶宝林等, 1998), 但其有关蛋白质化学成分方面尚未见报道。蛋白质是生命科学中一类重要而复杂的生物大分子, 它在生理、生化、医学、食品、保健、农业和环境等方面都有十分重要的意义。有机物中大多是大分子物质且与骨结构相关, 提取分离, 结构鉴定难度较大。而蛋白质分子的分离、纯化是生命科学研究中重要的一个环节。随着生命科学技术分离手段的发展, 特别是高效液相色谱的出现和不断的完善, 它可以将复杂的蛋白质在不同的液相色谱模式上得到分离并能得到需要的蛋白质。体积排阻色谱法是分离蛋白质和纯化蛋白质较常用而比较理想的一种方法 (师治贤等, 1992)。采用此法可以确定塞隆骨与虎骨的骨胶蛋白分子量。骨胶蛋白 A 部位: 白色粉末状物, 分子量范围为 125000 左右; 骨蛋白 B 部位: 为一混合物, 其中 B₁ 为灰白色粉末状物, 分子量范围为 12000 左右, B₂ 为灰白色粉末状物, 分子量未定。

实 验 部 分

1. 实验材料

塞隆 [高原鼯鼠 (*Myospalax baileyi*)] 骨的干燥全骨架, 1994 年秋在青海的门源县

* 国家“八五”科技攻关资助项目。

本文于 1997 年 10 月 5 日收到。

采高原麝鼠 2000 只，经煮死刮净皮肉得。

虎 (*Panthera tigris altaica*) 骨干燥全骨架，1994 年购自西宁人民公园。

2. 骨胶原蛋白提取及分离

塞隆骨与虎骨全骨粉碎过 64 孔筛，40℃通风干燥 3 天称重各 1000g，室温下丙酮浸提 4 次以上，至浸提液无色后，在旋转蒸发仪 40℃下回收浸提液，得棕色清亮塞隆骨油（得率 4.8%）和黄色清亮的虎骨油（得率 14.0），无水硫酸钠脱水后置冰箱供实验备用。

骨胶原蛋白的提取及分离流程 上述骨粉挥尽丙酮，加蒸馏水（分别为 10、8、6 倍量）煮沸 3 次（分别为 8、6、4 小时），合并煮提液后过滤，浓缩，水浴锅上分别浓缩至 2 倍量体积，以 50% 和 90% 乙醇分步沉淀处理后分别得到 3 个化学分离部位。即，A（50% 乙醇沉淀物），塞隆骨 A (Mb. A) 得率 2.9%、虎骨 A (Pt. A) 得率 2.1%；B（90% 乙醇沉淀物），塞隆骨 B (Mb. B) 得率 4.5%、虎骨 B (Pt. B) 得率 4.2%；C（90% 乙醇溶解物），塞隆 C (Mb. C) 得率 5.6%、虎骨 C (Pt. C) 得率 3.9%。

样品制作 将以上塞隆骨与虎骨 A、B 部位分别进行葡聚糖凝胶色谱纯化，然后进行透析，透析后的样品经冷冻干燥后分别称取相同量（10mg）溶解在 5ml 蒸馏水（A、B）及甲醇（C）中，用 0.5 μ m 的水系滤膜（A、B）及有机过滤膜（C）过滤置冰箱备用。

塞隆骨与虎骨的 A 和 B 部位蛋白及其胶原蛋白的含量测定参见中华人民共和国药典半微量氮测定法和中药药理实验方法学（中华人民共和国药典，1990；李仪奎等，1991），蛋白含量按含氮量 17% 计算，胶原蛋白含量以含羟脯氨酸 13.4% 计算。

3. HPLC 仪器及实验条件

(1) 仪器和试剂 高压液相色谱仪 Waters 600E 配有 486 紫外检测器 746 电脑数据处理机。试剂 甲醇（北京化学试剂厂 A. R.）；冰醋酸（北京化工厂 A. R.）；丙酮（北京化学试剂厂 A. R.）；乙醇（安徽特级酒精总厂 A. R.）；无水硫酸钠（北京化学试剂三厂 A. R.）；磷酸二氢钾（北京化工厂 A. R.）；磷酸二氢钾（北京化工厂 A. R.）；去离子水；标准蛋白质 牛血清蛋白 (BSA MW=67000)，鸡卵清蛋白 (OVA MW=45500)， β -乳球蛋白 (β -Lac MW=35000)，糜蛋白酶元 (Chy MW=25000)，肌红蛋白 (Myo MW=17500)，和细胞色素 (Cyt MW=12200) 购自美国 Sigma 公司。标准蛋白质配制成 20mg/ml 水溶液，置 -4℃ 的冰箱中备用。

(2) 色谱条件

色谱柱 TSK-GEL 3000SW 7.5 \times 600mm。

流动相 K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液 (pH=6.8)

流速 1.0ml/分钟。

纸速 1cm/分钟。

进样量 10 μ L

紫外检测 波长 280nm，254nm；灵敏度 0.010AUFS

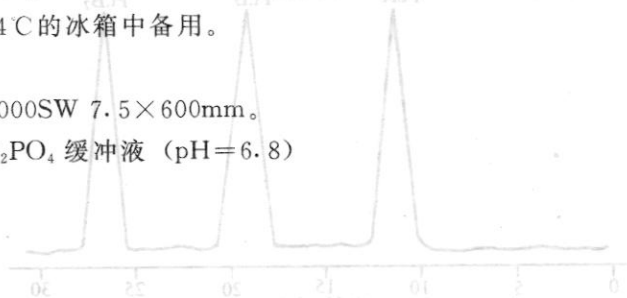


图 3 塞隆骨与虎骨 A、B 部位蛋白在 TSK-GEL 3000SW 上的分离
Fig. 3 Separation of A, B proteins of bone of *Sealong* and tiger on TSK-GEL 3000SW

结果与讨论

塞隆骨与虎骨的骨胶蛋白及胶原蛋白含量(%)见表1。标准蛋白在TSK-G3000SW上的分离见图1。塞隆骨与虎骨的A和B部位蛋白在TSK-G3000SW上的分离见图2。蛋白质的分子量与样品洗脱保留时间关系见图3。

表1 塞隆骨与虎骨的骨胶蛋白及胶原蛋白含量(%)

Table 1 Contents of glue protein and collagen in bone of Sailong and tiger (%)

项目 Item	总氮 Total N	蛋白氮 Nitrogen of protein	蛋白质 Protein	羟脯氨酸 Hydroxyproline	胶原蛋白 Collagen
Mb. A	13.9	13.7	80.6	8.88	66.3
Pt. A	13.4	13.2	77.6	9.48	70.7
Mb. B	12.6	11.1	65.3	6.94	51.8
Pt. B	12.9	11.8	69.4	8.09	60.4

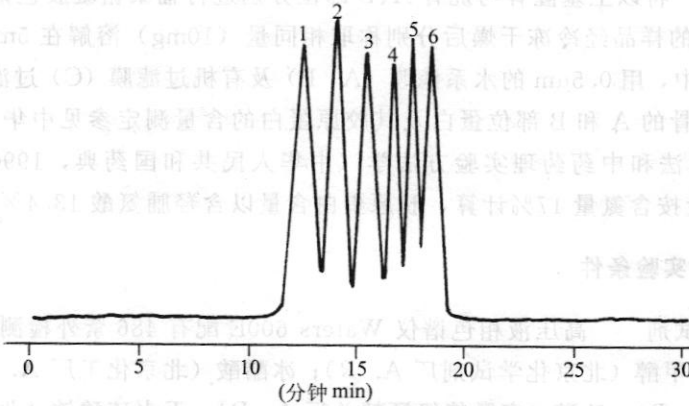


图1 标准蛋白在TSK-G3000SW上的分离

Fig. 1 Separation of Standard Proteins on TSK-G3000SW

1. 牛血清蛋白 (BSA) 2. 鸡卵清蛋白 (OVA) 3. β -乳球蛋白 (β -Lac)
4. 糜蛋白酶元 (Chyn) 5. 肌红蛋白 (Myo) 6. 细胞色素 (Cyt)

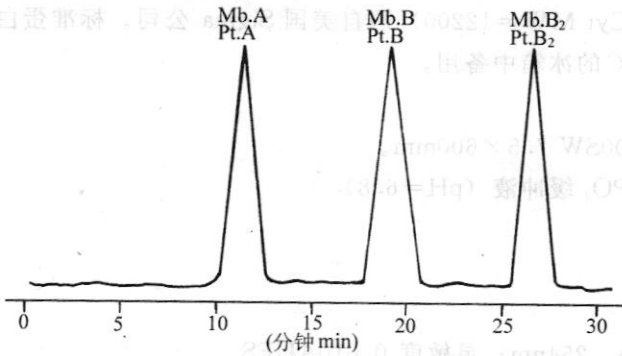


图2 塞隆骨与虎骨A和B蛋白在TSK-G3000SW上的分离

Fig. 2 Separation of A, B Proteins of bone of Sailong and tiger on TSK-G3000SW

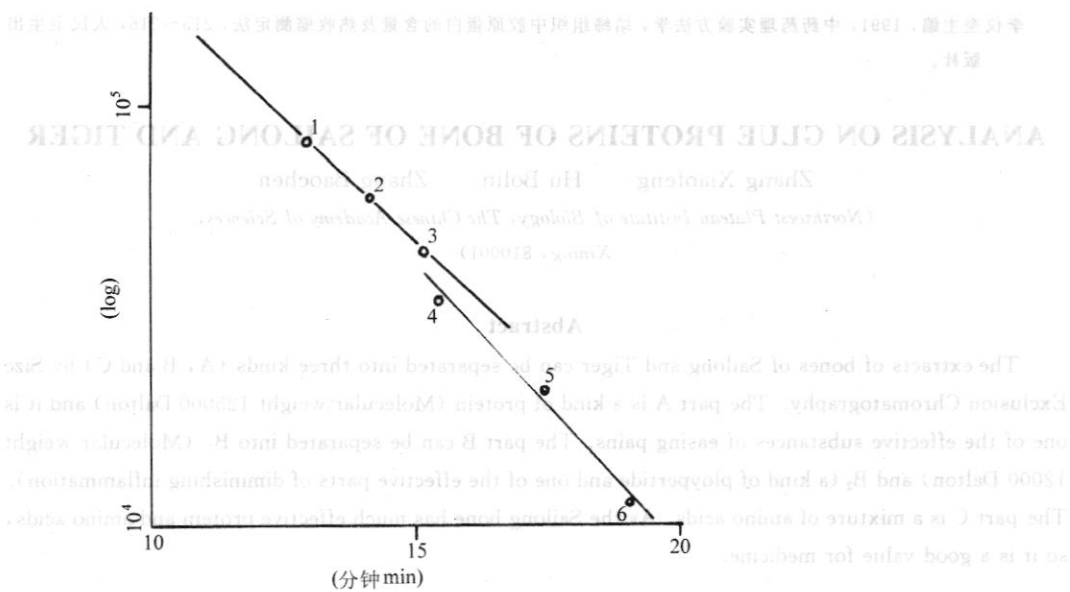


图3 蛋白质的分子量与样品洗脱保留时间关系
 Fig. 3 The correlation of the elution retaining time of samples and formulate of protein

1. 牛血清蛋白 (BSA) 2. 鸡卵清蛋白 (OVA) 3. β-乳球蛋白 (β-Lac)
4. 糜蛋白酶元 (Chyn) 5. 肌红蛋白 (Myo) 6. 细胞色素 (Cyt)

将塞隆骨和虎骨的水煎液进行有效化学成分的分离，经乙醇分步沉淀处理分成了三个部位。即50%乙醇沉淀(A)，有很好镇痛效果；90%乙醇沉淀(B)；90%乙醇溶解部分(C)，有较好消炎作用。对塞隆骨和虎骨的乙醇沉淀A、B进一步纯化，凝胶柱层析分离，得到3种蛋白质，称为塞隆骨、虎骨蛋白A，塞隆骨、虎骨蛋白B₁和塞隆骨、虎骨蛋白B₂，均显示一定的消炎或镇痛作用。采用体积排阻色谱方法确定塞隆骨与虎骨的骨胶原蛋白A分子量范围为125000左右，白色粉末状，难溶于有机溶剂、易溶于水，在45%乙醇溶液中完全沉淀析出。药理学研究证明骨蛋白A部位为塞隆骨镇痛的主要有效部位之一，工艺学研究证明骨蛋白A在常压下，100℃沸水蒸提中性质稳定。骨胶原蛋白B为一混合物，其中B₁子量范围为12000左右为灰白色粉末状。B₂分子量未定，灰白色粉末状，B有一定的消炎和镇痛作用，但强度远低于骨蛋白A及游离氨基酸部位C，B在100℃沸水蒸提中也较稳定，在90%乙醇溶液中析出。

塞隆骨与虎骨的A、B、C有机物提取率无明显差异，仅虎骨油的含量高出血塞隆骨油的3倍，在骨胶有机物中大部分是蛋白质，其中A、B是以胶原蛋白为主，比例相当。塞隆骨与虎骨的A、B部位蛋白分子量范围测定，证实了在相同实验条件下得到的塞隆骨与虎骨的A、B蛋白分子量范围基本相同。以上实验表明塞隆骨作为虎骨的代用品具有较好的药用价值。

参 考 文 献

中华人民共和国药典，1990，半微量氮测定法，45页，人民卫生出版社。
 叶宝林、郭鹏举，1998，青藏药用动物，338页，陕西科学出版社。
 师治贤、王俊德，1992，生物大分子的液相色谱分离和制备，科学出版社。

李仪奎主编, 1991, 中药药理实验方法学, 结缔组织中胶原蛋白的含量及热收缩测定法, 215~216, 人民卫生出版社。

ANALYSIS ON GLUE PROTEINS OF BONE OF SAILONG AND TIGER

Zhang Xiaofeng Hu Bolin Zhang Baochen

(Northwest Plateau Institute of Biology, The Chinese Academy of Sciences,
Xining, 810001)

Abstract

The extracts of bones of Sailong and Tiger can be separated into three kinds (A, B and C) by Size Exclusion Chromatography. The part A is a kind of protein (Molecular weight 125000 Dalton) and it is one of the effective substances of easing pains. The part B can be separated into B₁ (Molecular weight 12000 Dalton) and B₂ (a kind of ployptide and one of the effective parts of diminishing inflammation). The part C is a mixture of amino acids. As the Sailong bone has much effective protein and amino acids, so it is a good value for medicine.

Key words: Size Exclusion Chromatography; Glue Proteins of Bone of Sailong and tiger

三丁加合... (The text is extremely faint and largely illegible, appearing to be a detailed description of the chromatography results and protein analysis.)

参考文献

- 1. 李仪奎, 1991, 中药药理实验方法学, 人民卫生出版社。
- 2. ...
- 3. ...