

凝胶电泳分离-液相色谱-质谱法分析林蛙油及其伪品中的特异性蛋白

林 燕, 徐 蕾, 李重九, 马晓东

(中国农业大学理学院, 北京 100193)

摘要: 本研究应用凝胶电泳分离、蛋白酶酶解、纳升液相色谱分离、串联质谱检测、数据库检索等技术, 建立了林蛙油及伪品青蛙输卵管、牛蛙卵巢、牛蛙输卵管和明太鱼输卵管中特异性蛋白的鉴定方法。根据定性肽段数量、肽段的响应高低, 蛋白在电泳图谱中条带位置的特异性等因素综合判断, 筛选出林蛙油及其相关伪品的特异性蛋白, 通过对特异性蛋白的分析测定, 判断样品的真伪。采用该方法对市场中的4种林蛙油产品进行检测, 通过分析特异性蛋白, 发现所检测的样品均为林蛙油伪品。研究表明, 利用凝胶电泳分离液相色谱质谱法构建的特异性蛋白识别技术可以有效检测林蛙油产品的真伪。

关键词: 林蛙油; 凝胶电泳分离; 液相色谱-质谱; 特异性蛋白

中图分类号: O657.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-2997(2017)02-0227-07

doi: 10.7538/zpxb.youxian.2016.0068

Analysis of Specific Proteins in *Oviductus Ranae* and its Adulterants by Gel Electrophoresis Coupled LC/MS

LIN Yan, XU Lei, LI Chong-jiu, MA Xiao-dong

(College of Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: A method for the identification of *Oviductus ranae* samples was established by gel electrophoresis combined with nano liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS). The samples including *Oviductus ranae*, *Rana catesbeiana* fallopian tube, *Rana catesbeiana* ovary, *Rana nigromaculata* ovary and walleye pollack fallopian tube were extracted by using the TCA acetone precipitation method. Comprehensive application of gel electrophoresis, enzymatic hydrolysis, nano liquid chromatography, series spectrum detection and database retrieval technology were carried on the analysis to the proteins of *Oviductus ranae*. At the same time, the proteins of market samples were analyzed using the same method and compared with the proteins in *Oviductus ranae*. The results show that the specific protein bands distribution of *Oviductus ranae* and the counterfeits are different, so the authenticity of *Oviductus ranae* samples is able to be detected by

收稿日期: 2016-03-09; 修回日期: 2016-07-06

基金项目: 科技部支撑计划《功能食品质量安全保障技术研究》(2012BAD33B02)资助

作者简介: 林 燕(1974—), 女(汉族), 福建人, 副研究员, 从事分析化学研究。E-mail: linyan@cau.edu.cn

通信作者: 马晓东(1975—), 男(汉族), 山西人, 副教授, 从事分析化学研究。E-mail: dongxm@cau.edu.cn

网络出版时间: 2016-12-28; 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20161228.0937.030.html>

the comparison of the specific protein bands. The method is reliable for the recognition of specific proteins in *Oviductus ranae*.

Key words: *Oviductus ranae*; gel electrophoresis; liquid chromatography-mass spectrometry; specific proteins

中国林蛙 (*Rana temporaria chensinensis* David) 属蛙科动物, 民间俗称哈士蟆、黄蛤蟆等, 《本草图经》和《本草纲目》中所记载的“山蛤”即为林蛙。中国林蛙主要生长在长白山山脉, 全身可入药, 特别是林蛙油, 更以稀少而珍贵。林蛙油 (*Oviductus ranae*) 又称为蛤蟆油、田鸡油、雪蛤, 来源于中国林蛙雌蛙的干燥输卵管。现代研究表明, 林蛙油主要含有蛋白质、氨基酸、脂肪酸、激素和维生素等成分, 不仅具有抗衰驻颜的神奇功效, 还具有抗疲劳、降血脂、提高机体免疫功能和增强应激性等作用, 是一种兼具药用、食补和美容的高级营养品^[1-7]。

近些年, 由于森林资源的过度利用, 中国林蛙的生存环境遭到破坏, 然而市场上对于林蛙油的需求越来越大, 致使林蛙油伪品大量出现。常见的林蛙油伪品以牛蛙输卵管、牛蛙卵巢、青蛙卵巢和明太鱼输卵管等制成。中国林蛙油的传统鉴定方法可参见《中国药典》林蛙油质量标准规定, 主要包括样品基源、膨胀度、显微结构、理化性质等, 一般用于鉴定未经加工的林蛙油干品, 难以鉴定深度加工后失去原始形状或改变理化性质的加工品, 无法控制林蛙油的质量^[8-9]。所以, 亟待开发准确、快速、可靠的检测方法用于林蛙油及其制品的真伪鉴定。

质谱技术凭借高灵敏度、高通量等特点在蛋白质检测及鉴定方面得到快速发展, 现已成为蛋白质和生物大分子研究领域的重要分析技术^[10-18]。林蛙油作为动物源产品, 富含蛋白质, 但是目前尚无林蛙油特异性蛋白的研究报道。

本研究以林蛙油(即林蛙输卵管组织)为材料, 将蛋白提取后分离纯化, 酶解后进行质谱分析。同时, 对林蛙油相关伪品牛蛙输卵管、牛蛙卵巢、青蛙卵巢和明太鱼输卵管组织中的蛋白进行分析, 并与林蛙油中的蛋白进行比较, 确定每种样品的特异性蛋白。通过对市场上林蛙油产品进行测定, 找出其中的特异性蛋白, 研究以林蛙油中特异性蛋白作为真伪鉴别的方法。

1 实验部分

1.1 主要仪器

液相色谱-质谱联用仪: Ultimate 3000 RSLCnano 纳升液相色谱仪, 配有 Nanospray Flex 纳喷离子源(NSI), LTQ XL 质谱仪, 美国 Thermo 公司产品; 超声波细胞破碎仪: 宁波新芝生物仪器公司产品; MIKRO 220R 型高速冷冻离心机: Hettich Zentrifugen 公司产品。

1.2 主要材料与试剂

乙腈: 色谱纯, 美国 Fisher 公司产品; 二硫苏糖醇、胰蛋白酶: 美国 Sigma 公司产品; 三氟乙酸、吡啶-3-乙酸、PBS(pH 7.5)、SDS-PAGE 上样缓冲液、蛋白 Marker: 北京康为试剂生物科技有限公司产品; 丙酮、尿素、 NH_4HCO_3 、醋酸、乙腈、甲酸: 均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司产品。

林蛙油样品: 2013 年 10 月采自吉林省白山市, 于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 备用; 青蛙输卵管、牛蛙输卵管、牛蛙卵巢样品: 2013 年 11 月采自广东省东莞市, 于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 备用; 明太鱼输卵管样品: 2013 年 12 月采自辽宁省大连市, 于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 备用。

1.3 实验条件

1.3.1 细胞破碎及蛋白提取(TCA 丙酮沉淀法)

将动物组织用 PBS 冲洗后置于研钵中, 液氮条件下研磨样品至粉末, 加入裂解液后制成组织悬浊液, 冰上孵育 30 min。超声裂解组织悬浊液, 功率 300 W, 间隔 2 s 超声 2 s, 共计有效超声时间 3 min; 然后于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 以 10 000 r/min 离心 30 min, 将蛋白提取液加入 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 预冷丙酮中, 混匀后于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 沉淀过夜, 最后去除丙酮溶液, 向沉淀中加入 8 mol/L Urea 涡旋溶解, 备用。

1.3.2 SDS-PAGE 电泳 将 1.3.1 节得到的溶液和 5 倍上样缓冲液按 1:4 比例混合, 置于 EP 管中; 水浴加热, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 保持 2 min, 冷却后以 10 000 r/min 离心 20 min。

将分离得到的蛋白进行 SDS-PAGE 胶分离,其浓缩胶 12%,分离胶 5%。电泳经考马斯亮蓝 R-250 染色后,保存于含有 5% 醋酸溶液的培养皿中。

1.3.3 蛋白酶解 按照分子质量将凝胶蛋白条带切成若干块,切下的胶块放入 EP 管中,用 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液和乙腈脱色后,加乙腈脱水至胶块完全变白,氮气吹干。向样品中加入 80 μL 10 mmol/L DTT(二硫苏糖醇),56 $^\circ\text{C}$ 水浴恒温 1 h;冷却后加入 80 μL 55 mmol/L IAM(碘乙酰胺),置于黑暗处,室温保持 45 min;用 25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液清洗样品后,氮气吹干。加入 Trypsin 酶液进行酶解,然后加入 25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液,37 $^\circ\text{C}$ 水浴过夜(8~12 h);最后加入 2% 甲酸溶液终止反应,取上清液,备用。

1.3.4 质谱分析 样品经反相高效液相色谱 C18 柱(75 $\mu\text{m} \times 15 \text{ mm} \times 2 \mu\text{m}$) 分离后,进入 LTQ XL 系统分析。样品在反相柱上的洗脱梯度是 2%~40% 乙腈(含 0.1% 甲酸),洗脱时间 43 min,流速 300 nL/min。

质谱参数:离子传输线温度 350 $^\circ\text{C}$;电喷雾电压 1.85 kV;一级质谱扫描范围 m/z 350~1 800,从中选取信号最强的 10 个母离子进行二级质谱分析;CID 碰撞能量 35 eV。

1.3.5 数据库检索 将质谱数据通过 Thermo Proteome Discoverer 1.4 软件进行分析处理,采用氧化、磷酸化和加脲甲基基团修饰蛋白,检索 Uniprot 数据库(数据库名称 uniprot-organism-frog.fasta 和 uniprot-Theragra + chalcogramma.fasta),得到相应的蛋白信息。分析蛋白覆盖率、肽段以及保留时间,并在 <http://www.uniprot.org/> 网站上检索蛋白名称及功能。

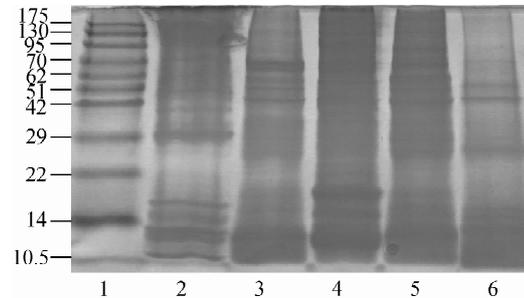
1.3.6 市场上林蛙油产品真伪的鉴定 分别提取不同厂家林蛙油样品中的蛋白质,然后进行凝胶电泳分离、液相色谱-质谱检测。得到的结果经数据库分析检索,与林蛙油及其伪品的特异性蛋白分析比对,判定样品的来源及真伪。

2 结果与讨论

2.1 SDS-PAGE 电泳

样品组织的蛋白提取液 SDS-PAGE 电泳

谱图示于图 1。可以看出,林蛙油与青蛙输卵管、牛蛙卵巢、牛蛙输卵管及明太鱼输卵管样品的蛋白条带分布存在明显区别。



注:条带 1—marker、2—林蛙输卵管(林蛙油)、3—青蛙输卵管、4—牛蛙卵巢、5—牛蛙输卵管、6—明太鱼输卵管;marker 左侧为条带对应蛋白大小(kDa)

图 1 林蛙油及部分代表性伪品的电泳谱图

Fig. 1 SDS-PAGE of protein from *Oviductus ranae* and its adulterants

市场样品一般经过深度加工,可能有两种或两种以上样品同时存在,所以电泳图谱不能作为判定林蛙油样品真伪的依据,只能作为质谱检测的预分离。

2.2 林蛙油及其相关伪品的蛋白质谱分析

将凝胶分为 3 个区域:175~42 kDa(编号 1)、42~22 kDa(编号 2)、22~10.5 kDa(编号 3)。将样品切胶、脱色、二硫键还原和烷基化后,用 Trypsin 酶酶解,多肽溶液经纳升液相色谱-质谱仪分析。

原始数据文件采用 Thermo Proteome Discoverer 1.4 软件搜索 Uniprot 数据库,可得到蛋白或肽段有关信息。根据蛋白编码分析蛋白,整合分析结果中的类型、覆盖率、蛋白片段、保留时间、分子质量等信息,经检索和样品间的比对,林蛙油样品、青蛙输卵管样品、牛蛙卵巢样品、牛蛙输卵管样品和明太鱼输卵管样品分别有 38、115、96、105 和 14 个差异蛋白。

2.3 林蛙油与其伪品的差异蛋白分析

根据 2.2 节对林蛙油及其伪品的蛋白分析结果,取覆盖率较高的前 10 个差异蛋白,肽段置信度为中等($\text{FDR} \leq 0.05$),每个蛋白中最低特异性肽段数为 1。根据分子质量大小、肽段响应情况以及保留时间,找出该蛋白所对应

的胶点位置,筛选出用于真伪鉴别的特异性蛋白,其结果列于表 1。样品总离子流色谱图和代表性的定性肽段质谱图示于图 2~6。

从林蛙油中筛选出的特异性蛋白分布在电

泳图谱的 42~22 kDa 区间。因此,如果分析市场上的样品是否含有林蛙油成分,只需将电泳胶条区域编号为 2 的部分进行质谱分析,寻找林蛙油的特异性蛋白即可。

表 1 林蛙油及其相关伪品的特异性蛋白

Table 1 Specific proteins in *Ovidutus ranae* and its adulterants

来源	蛋白编码	分子质量/kDa	定性肽段	保留时间/min	肽段响应	胶点位置	蛋白名称
林蛙油	Q6DDC2	20.2	GDLLFLTNFQEDPIR	36.66	高	2	Signal peptidase I
青蛙	Q6DK74	55.3	INAWNSDTLPIYEPGLK	31.47	高	1	UDP-glucose
输卵管			ISSINSISALCEATGADVEEVAR	32.26	高		6-Dehydrogenase
			YWQQVIDMNDYQR	28.48	高		
			IIDCLFNTVADKK	25.15	高		
			VTVVDVNEAR	17.91	高		
牛蛙	F6QFQ2	51.9	LEVGMVGVNEGLSSVECPFGGVK	37.66	高	1	Uncharacterized
卵巢			WYDLMIQNKEDLAK	26.27	高		Protein
牛蛙	Q5BKM2	22.6	NDGQYKGDPSWFMK	27.58	高	3	Transgelin
输卵管			TIVALGSIAVTK	26.58	高		
			NLLIAGLQAR	26.65	高		
明太鱼	Q8AV86	32.62	AMKDEEKMELQEIQLK	22.88	高	2	Tropomyosin
输卵管			LATALTKLEEAEKAADESER	24.98	高		
			LATALTKLEEAEK	21.84	高		
			MELQEIQLK	25.33	高		
			HIAEEADRKYEEVAR	15.26	高		
			KLVIHESDLER	22.18	高		

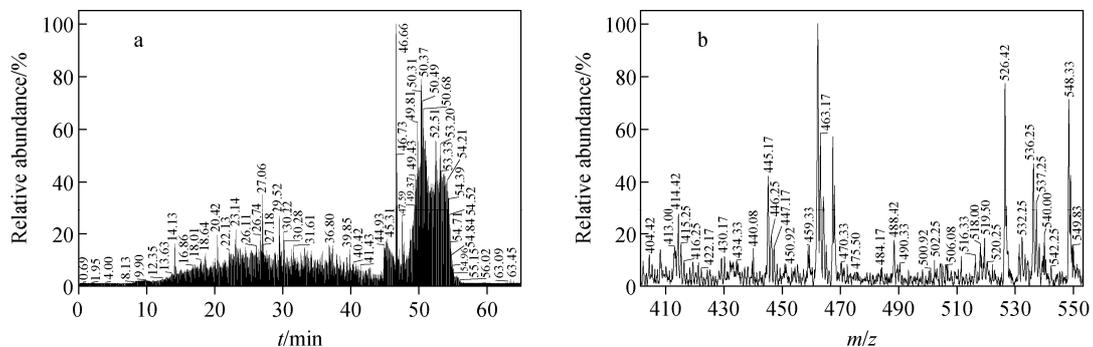


图 2 林蛙油样品总离子流色谱图(a)和特异性蛋白 Q6DDC2 的定性肽段 GDLLFLTNFQEDPIR 的二级质谱图(b)

Fig. 2 TIC of *Oviductus ranae* (a) and mass spectra of qualitative peptide GDLLFLTNFQEDPIR from the specific protein Q6DDC2 (b)

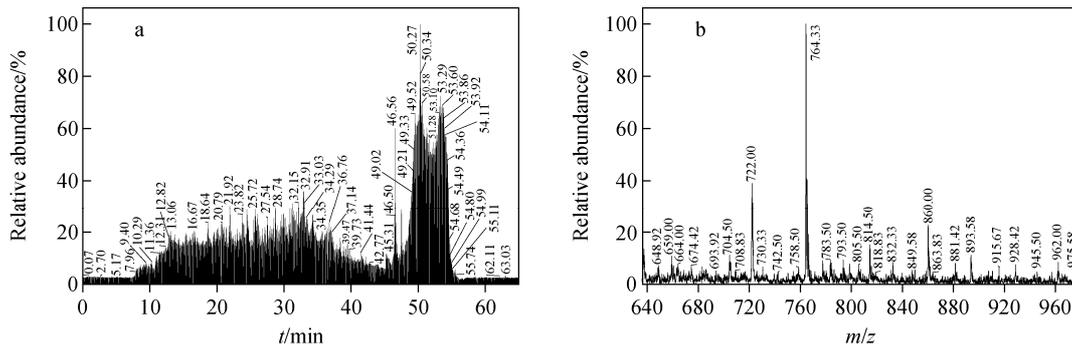


图6 明太鱼输卵管样品总离子流色谱图(a)和特异性蛋白 Q8AV86 的定性肽段 KLVHESDLR 的二级质谱图(b)

Fig. 6 TIC of *Theragra chalcogramma* fallopian tube (a) and mass spectra of qualitative peptide KLVHESDLR from the specific protein Q8AV86 (b)

2.4 市场样品的测定

对4种市场上的林蛙油产品进行分析,产品信息列于表2。

表2 市场样品信息

Table 2 Information of market samples

样品编号	商品名称	产地	性状
1	林蛙油	吉林	黄色固体
2	雪蛤净油	吉林	棕色固体
3	雪蛤油	吉林	棕色固体
4	蛤蟆油软胶囊	吉林	浅黄色胶囊

对市场样品进行蛋白提取后,采用电泳分离法分析3个电泳胶条区域。通过对数据进行分析检索和比对,市场样品中所含的特异性蛋白情况列于表3。

表3 市场样品中特异性蛋白检测结果

Table 3 Results of specific protein in the market samples

样品名称	蛋白编码	样品编号			
		1	2	3	4
林蛙油	Q6DDC2	×	√	√	×
青蛙输卵管	Q6DK74	×	×	×	×
牛蛙卵巢	F6QFQ2	×	×	×	×
牛蛙输卵管	Q5BKM2	√	√	√	×
明太鱼输卵管	Q8AV86	×	×	×	√

注:“√”表示样品中检出特异性蛋白;“×”表示样品中未检出特异性蛋白

经分析,1号样品为牛蛙输卵管,2号和

3号样品为林蛙油和牛蛙输卵管混合物,4号样品为明太鱼输卵管。

3 结论

采用 SDS-PAGE 电泳分离、纳升液相色谱-质谱法分析林蛙油及其相关伪品的蛋白质,根据定性肽段数量、肽段响应高低、蛋白在电泳图谱中条带位置的特异性等因素,筛选出林蛙油及其相关伪品的特异性蛋白。通过对林蛙、青蛙和牛蛙生殖组织中的蛋白进行生物质谱分析,分别找出其中的特异性蛋白,并比对特异性蛋白检测结果,该方法可以有效地判断样品的真伪。

参考文献:

- [1] 潘红平. 药用动物养殖及其加工利用[M]. 北京:化学工业出版社,2007:154.
- [2] 刘景圣,孟宪军. 功能性食品[M]. 北京:中国农业出版社,2005:86.
- [3] 范玉林,崔香顺,姚玉霞. 蛤士蟆油化学及药理学研究概况[J]. 吉林农业大学学报,1996,18(3):105.
FAN Yulin, CUI Xiangshun, YAO Yuxia. Chemical and pharmacological research of *Ranae Oviductus*[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 1996,18(3): 105(in Chinese).
- [4] 宗颖,张辉. 哈蟆油化学成分的研究进展[J]. 吉林中医药,2006,26(12):76-77.
ZONG Ying, ZHANG Hui. Research progress on chemical constituents of *Oviductus ranae*[J]. Journal of Jilin Traditional Chinese Medicine,

- 2006, 26(12): 76-77(in Chinese).
- [5] JIU BTQG. About oviductas ranae research on oviductas ranae oral[J]. Japanese Med Anal, 1934, (18): 39.
- [6] WANG D H, WU W, TIAN J M, et al. Effect of *Oviductus ranae* and *Oviductus ranae* eggs on bone metabolism and osteoporosis[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2013, 19(7): 532-538.
- [7] HUANG D, YANG L, WANG C, et al. Immunostimulatory activity of protein hydrolysate from *Oviductus ranae* on macrophage in vitro[J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2014, (2014): 180 234-180 245.
- [8] 崔岩,侯晓东,崔春月,等. 中国林蛙油鉴别方法研究进展及建议[J]. 林蛙养殖,2007,(10):37-39.
CUI Yan, HOU Xiaodong, CUI Chunyue, et al. Research progress and suggestions on the identification method of *Oviductus ranae* [J]. Rana Chensinensis Feeding, 2007, (10): 37-39 (in Chinese).
- [9] 张嵩,王维宁,陈芳芳,等. 蛤蟆油与类似品和伪品的质量评价[J]. 沈阳药科大学学报,2012,29(12):951-958.
ZHANG Song, WANG Weining, CHEN Fangfang, et al. Quality evaluation of Ranae Oviductus, its analogous and adulterant materials[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2012, 29(12): 951-958(in Chinese).
- [10] 赵宏宇,刘回民,李稼晖. 林蛙油保健功能及其蛋白分离纯化的研究进展[J]. 农产品加工, 2013,(7):28-30.
ZHAO Hongyu, LIU Huimin, LI Jiahui. Health functions, protein isolation and purification of *Ovidutus ranae*[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2013, (7): 28-30(in Chinese).
- [11] 卜旺雨,齐义军,魏华. 凝胶电泳蛋白质组学蛋白样品纯化方法比较[J]. 解剖学报,2013,44(6):865-867.
BU Wangyu, QI Yijun, WEI Hua. Comparison of protein preparation methods for gel-based proteomics[J]. Acta Anatomica Sinica, 2013, 44(6): 865-867(in Chinese).
- [12] 乔晓强,王蕊,张丽华. 肽段化学衍生技术及其在质谱高灵敏度鉴定中的应用进展[J]. 分析化学,2012,40(7):1 123-1 129.
QIAO Xiaoqiang, WANG Rui, ZHANG Lihua. Recent advancement of chemical derivatization and its applications to high sensitive analysis of peptide in mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2012, 40(7): 1 123-1 129(in Chinese).
- [13] KARLSSON H, LARSSON J M, THOMSSON K A. High-throughput and high-sensitivity nano-LC/MS and MS/MS for O-Glycan profiling[J]. Methods in Molecular Biology, 2009, 534: 117-131.
- [14] SUGIYAMA N, MASUDA T, SHINODA K, et al. Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2007, 6(6): 1 103-1 109.
- [15] 彭翱,赵芊,江骥,等. 质谱在生物标志物研究中的应用[J]. 质谱学报,2011,32(1):31-34.
PENG Xiang, ZHAO Qian, JIANG Ji, et al. Mass spectrometry in biomarker investigation [J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2011, 32(1): 31-34(in Chinese).
- [16] 卫军营,张养军,陈明覃,等. 液质联用技术中不同蛋白质鉴定策略的比较[J]. 质谱学报,2008, 29(4):226-230.
WEI Junying, ZHANG Yangjun, CHEN Mingtan, et al. Effect of different experimental measures in a nano-scale high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry on protein discovery rate[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2008, 29(4): 226-230(in Chinese).
- [17] INTELICATO-YOUNG J, FOX A. Mass spectrometry and tandem mass spectrometry characterization of protein patterns, protein markers and whole proteomes for pathogenic bacteria[J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 92(3): 381-386.
- [18] COLANGELO C M, CHUNG L, BRUCE C, et al. Review of software tools for design and analysis of large scale MRM proteomic datasets[J]. Methods, 2013, 61(3): 287-298.