

僵蚕药材蛋白质分级指纹图谱建立及产地鉴定相关分子研究

宋美莹¹,王立勇¹,王巧宇¹,张林松²,徐卫东¹,汤建³,闻崇炜^{1*}

¹江苏大学药学院,镇江 212013;²镇江市食品药品监督检验中心,镇江 212050;³亳州学院中药学院,亳州 236800

摘要:建立云南与四川僵蚕药材的总蛋白质指纹图谱及分级指纹图谱,对比分析以发现其中的差异表达蛋白质分子并进行鉴定及生物信息学分析,探索其用于产地鉴定的可行性。提取两种僵蚕的酸溶、碱溶、水溶及醇溶性总蛋白质,对其进行丙酮分级沉淀,对所得样品进行 SDS-PAGE 指纹图谱对比分析,对所得差异条带进行 LC-MS/MS 分析,数据库检索后进行生物信息学分析。两种僵蚕的总蛋白质指纹图谱相似度很高,难以据此进行产地鉴定;两种僵蚕的分级指纹图谱则有较显著差异,有望用于产地鉴定;依据分级指纹图谱差异共鉴定出 β -葡萄糖苷酶、抗胰凝乳蛋白酶、抗胰蛋白酶、含脂肪酶结构域蛋白等 273 种蛋白质。云南与四川僵蚕的蛋白质组成及其分级指纹图谱存在显著差异,有望用作产地鉴定的分子依据;醇溶蛋白质构建分级指纹图谱可以提供更加丰富的信息及更好的分辨率;分级指纹图谱技术具有简便易行、分辨率较高的优点,为其他中药材的产地鉴定研究提供了方法学思路。

关键词:僵蚕;蛋白质;分级指纹图谱;产地鉴定

中图分类号:R282.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)9-1486-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.9.003

Study on establishment of protein grading fingerprint of Bombyx Batryticatus and its correlated molecules of geographical origin identification

SONG Mei-ying¹, WANG Li-yong¹, WANG Qiao-yu¹,
ZHANG Lin-song², XU Wei-dong¹, TANG Jian³, WEN Chong-wei^{1*}

¹School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

²Zhenjiang Food and Drug Supervision and Inspection Center, Zhenjiang 212013, China;

³Traditional Chinese Medicine College, Bozhou University, Bozhou 236800, China

Abstract: To establish and compare the total protein fingerprints and the fractional fingerprints of Bombyx Batryticatus from Yunnan and Sichuan, and to discover the differentially expressed protein molecules, and to identify and analyze them by mass spectrum and bioinformatics, to explore the feasibility of its application in geographical origin identification. The total acid-soluble, alkali-soluble, water-soluble and alcohol-soluble proteins of the two kinds of Bombyx mori were extracted, and they were fractionally precipitated with acetone. The SDS-PAGE fingerprints of the obtained samples were compared and analyzed. The differential bands were analyzed by LC-MS/MS, and the bioinformatics analysis was conducted after database retrieval. The similarity of the total protein fingerprints of these two kinds of Bombyx Batryticatus was very high, so it is difficult to use for geographical origin identification of this Chinese medicinal material. The fractional fingerprints of these two kinds of Bombyx Batryticatus were relatively different, which is expected to be used for the identification of its geographical origin. According to the difference of fractional fingerprints, 273 proteins including chymotrypsin inhibitor, trypsin inhibitor, fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein and lipase domain-containing protein were identified. There were significant differences in protein composition and fractional fingerprints between Bombyx Batryticatus from Yunnan and Sichuan, which were expected to be used as molecular basis for geographical origin identification. The construction of fractional fingerprints of alcohol-soluble proteins can provide more abundant information and better resolution. The fractional fingerprint technology has the advantages of simplicity and high resolution, which provides a methodological idea for the identification of other Chinese medici-

收稿日期:2023-02-13 接受日期:2023-05-05

基金项目:中央本级重大增减支项目(2060302);江苏省镇江市重点研发计划(社会发展)(SH2018023,SH2021010);中药原料产品研发安徽普通高校重点实验室(亳州学院)建设项目(KLAHEII18032)

*通信作者 E-mail:wenchw@ujs.edu.cn

nal materials.

Key words: Bombyx Batryticatus; proteins; fractional fingerprints; geographical origin identification

僵蚕 (*Bombyx Batryticatus*) 为家蚕幼虫在养殖中感染 (或人工接种) 白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillant 致死而形成的副产物, 具有息风止痉、祛风止痛、化痰散结的功效^[1]。由于我国“东桑西移”产业布局的实施, 四川与云南成为我国蚕桑产业大省, 也因而成为僵蚕药材的主要产区。由于四川产僵蚕比云南产的性状特征更符合历代本草典籍及 63、77 年版药典所述“身直肥壮、质坚色白、断面光亮”的优质僵蚕标准, 因此市场认可度更高, 销售价格也更高^[2-4]。市场调查中发现常有商家在销售中故意混淆两者产地以牟利, 为提高临床用药的安全性及有效性, 有必要对僵蚕产地鉴定方法开展研究。

众所周知, 中药材有效成分的形成和积累与其生长的自然条件有着密切关系, 因此产地是影响中药材质量的重要因素之一, 建立产地鉴定与溯源方法对满足消费者了解产品信息的需求、保护生产、加工、销售企业的权益、提升我国药材在国际市场上的竞争力具有重要作用。廖保生等提出可以基于分子生物学技术、中药指纹图谱技术、同位素示踪技术、无线射频识别溯源技术及条形码技术进行中药材的产地鉴定及溯源^[5]。蛋白质电泳为国际种子检验协会采纳的标准品种鉴定方法, 但该法尚有分辨率不高、难以进行种内鉴定的缺点, 难以用于中药材的产地鉴定与溯源。有鉴于此, 本文拟探索将分级沉淀及蛋白质电泳技术相结合建立分级指纹图谱技术的可行性, 以此分析云南及四川僵蚕的蛋白质组差异, 并对所得差异分子进行鉴定及生物信息学分析, 挖掘产地鉴定相关分子, 为建立简便易行、科学准确的产地鉴定方法提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药材

僵蚕药材购自荷花池、亳州、安国及玉林中药材市场, 四川产僵蚕 (以下均简称为川产) 批号分别为: 150510、160106、20160420、20150703; 云南产僵蚕 (以下均简称为滇产) 批号分别为: 130101、160512、201512082, 经江苏大学药学院欧阳臻教授鉴定为蚕蛾科昆虫家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus 4~5 龄的幼虫感染白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillant 而致死的干燥体。

1.2 试剂

丙烯酸胺 (批号: 20161017, 化学纯)、*N,N'*-亚甲基双丙烯酸胺 (20111012, 含量 $\geq 98.0\%$)、*N,N,N',N'*-四甲基乙二胺 (TEMED) (含量 $\geq 99.0\%$)、三 (羟甲基) 氨基甲烷 (Tris) (批号: 2021082, 含量 $\geq 99.0\%$)、十二烷基硫酸钠 (SDS) (含量 $\geq 99.0\%$)、甘氨酸 (Glycine) (批号: C1488777, 含量 99.0%)、牛血清白蛋白 (BSA) 等均购自生工生物工程 (上海) 有限公司。冰醋酸 (批号: 2016041301)、无水乙醇 (批号: 2211199)、过硫酸铵 (批号: 20181018)、三氯醋酸 (TCA) (批号: C14297217)、丙酮 (批号: 20200107)、甘油 (批号: T20090224)、EDTA (批号: 20140324) 纯度均为分析纯, 考马斯亮蓝 G-250 (批号: 71011284, 有效分光含量 $\geq 85.0\%$) 等购自国药集团化学试剂有限公司。蛋白质分子量标准购自 Fermentas 公司。

1.3 仪器

FE20 型实验室 pH 计 (Mettler Toledo 公司); SpectraMax 190 酶标仪 (Molecular Devices 公司); VE-180 垂直电泳槽 (上海天能科技有限公司); DYY-6C 稳流稳压电泳仪 (南京驰顺科技发展有限公司); GenoSens 2100 凝胶成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司); 岛津 UV-2550 紫外分光光度计 (Shimadzu 公司); nanoLC-Ultra 1D plus 高效液相色谱系统 (美国 Eksigent Technologies 公司); 配备 Nanospray Flex 离子源的 TripleTOF 5600 系统 (美国 AB Sciex 公司)。

1.4 方法

1.4.1 僵蚕蛋白质提取及定量

僵蚕药材水洗后置于 40 °C 下烘干, 粉碎后过 70 目筛备用。准确称取多份僵蚕药材粉末, 分别按液料比 60:1 (mL/g) 加入 0.1 mol/L NaAc 缓冲液 (pH 4.8)、60:1 (mL/g) 加入 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.6)、50:1 (mL/g) 加入 ddH₂O、25:1 (mL/g) 加入 40% EtOH, 25 °C 震荡提取 8 h, 13 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 即得僵蚕酸溶、碱溶、水溶、醇溶性总蛋白质。以 BSA 为标准品, Bradford 法测定样品中蛋白质含量并计算提取率, 样品置于 -80 °C 保存备用。

1.4.2 紫外检测

紫外可见分光光度计在 240~500 nm 波长范围

内对僵蚕蛋白质样品进行全波长扫描,得紫外检测图谱。

1.4.3 丙酮分级沉淀

取适量酸溶性蛋白质样品,滴加丙酮至终浓度为10% (V/V),静置20 min,13 000 r/min离心10 min后取沉淀,得酸溶性蛋白质10%沉淀部分,上清继续滴加丙酮至终浓度为20% (V/V),13 000 r/min离心10 min后取沉淀,得20%沉淀部分,上清同上处理,继续增加丙酮终浓度分别为30%、40%、50%、60%、70%、80% (V/V),收集各部分沉淀,依次可得30%、40%、50%、60%、70%、80%分级沉淀部分。同法处理碱溶、水溶、醇溶性蛋白质样品,可得各对应分级沉淀样品。

1.4.4 蛋白质电泳(SDS-PAGE)

取上述各分级沉淀样品,加适量ddH₂O及等体积2×上样缓冲液,煮沸10 min后进行SDS-PAGE^[6]。80 V恒压电泳至溴酚蓝指示剂距胶板底部边缘时结束电泳。结束后按常规方法进行剥胶、固定及染色,随后脱色至背景无色,电泳条带清晰。

1.4.5 图像分析及数据处理

采用GenoSens2100型凝胶成像系统采集凝胶图像,泳道对比以发现差异蛋白质分子,Quantity One 4.6.2软件进行图像分析,根据条带迁移率计算蛋白质分子量,根据条带灰度值计算蛋白质含量。

1.4.6 液质联用分析

凝胶中差异蛋白质样品常规胶内酶解后进行分析。液相条件:nanoLC-Ultra 1D plus系统,Eksigent C₁₈色谱柱(75 μm × 150 mm,3 μm)分离;流动相:0.1%甲酸水溶液(A)-含0.1%甲酸的乙腈溶液(B);梯度洗脱(0~55 min,5%→23% B;55~75 min,23%→52% B;75~76 min,52%→80% B;76~80 min,80% B;80~90 min,0%→5% B);流速:300

nL/min;检测波长:275 nm;柱温:50 ℃;进样量:7 μL。质谱条件:TripleTOF 5600系统,配备Nanospray Flex离子源,正离子模式进行扫描。质量范围m/z:350~1 500;S-Lens RF(射频电压)50 V,喷雾电压2 000 V,气帘气压力2 × 10⁶ Pa,雾化气压力3.4 × 10⁵ Pa,加热温度150 ℃,质谱扫描方式为IDA模式。一级TOF-MS单张图谱的扫描时间为250 ms,每次IDA循环下,最多采集40张电荷为+2~+5且单秒计数大于120的二级质谱,每张二级质谱的累积时间为50 ms。

1.4.7 数据库检索

质谱数据通过ProteinPilot (V4.5)检索,检索算法为Paragon。使用数据库为UniProt中Beauveria_bassiana和Bombyx_mori的蛋白质组参考数据库。检索参数如下:Sample Type选Identification;Cys Alkylation选Iodoacetamide;Digestion选Trypsin;Search Effort设置为Rapid ID。检索结果以Unused ≥ 1.3为标准进行筛选,删去反库中检索的条目和污染蛋白,余下鉴定信息用作后续分析。

1.4.8 生物信息学分析

采用eggNOG5.0(<http://eggnog5.embl.de/>)对检索得到的差异表达蛋白质分子进行基因同源性分类(Gene ontology, GO)功能注释分析、京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes, KEGG)代谢通路分析以及蛋白相邻类聚簇(Cluster of Orthologous Groups of Proteins, COG)功能分析。相关蛋白质详细信息通过Python实现数据可视化。

2 结果与分析

2.1 紫外光谱检测

按“1.4.2”所述对僵蚕蛋白质样品在240~500 nm波长范围内进行全波长扫描,结果显示,滇产僵

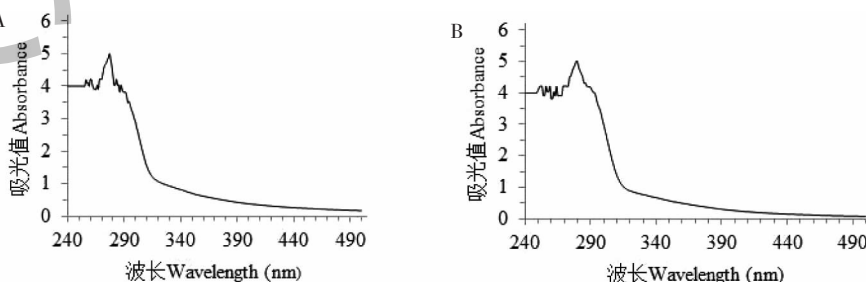


图1 紫外光谱扫描图

Fig. 1 Ultraviolet spectrum scan

注:A:滇产僵蚕;B:川产僵蚕。Note:A:Bombyx Batryticatus from Yunnan;B:Bombyx Batryticatus from Sichuan.

蚕的最大吸收波长是 277 nm,川产僵蚕的最大吸收波长是 279 nm(见图 1),因此后续液质联用分析中以 275 nm 为检测波长。

2.2 酸溶性蛋白质分级指纹图谱及差异分子研究

以 0.1 mol/L NaAc 缓冲液(pH 4.8)提取两地僵蚕药材的酸溶性总蛋白质,并对其进行 SDS-PAGE 指纹图谱分析,结果表明两者相似度极高,难以据此进行产地鉴定(图 2 第 1、2 泳道)。对酸溶性总蛋白质进行分级处理,再对所得分级样品进行 SDS-PAGE 指纹图谱分析,结果表明 10% ~ 30% 的

丙酮溶液可以沉淀出分子量在 27 kDa 以上的蛋白质,40% ~ 60% 的丙酮溶液可以沉淀出分子量在 5 ~ 36 kDa 的蛋白质,70% ~ 80% 的丙酮溶液可以沉淀出分子量小于 15 kDa 的蛋白质(图 2 第 3 ~ 18 泳道)。滇产及川产僵蚕的酸溶蛋白质均有分子量为 30.6 kDa 的蛋白质(图 2 中箭头 A 所示),同时分级指纹图谱对比分析表明,两种样品存在 4.95、27.11、29.40、30.42、36.91、38.93 kDa 的差异蛋白质条带(图 2 箭头 B、C、D、E、F、G 所示)。

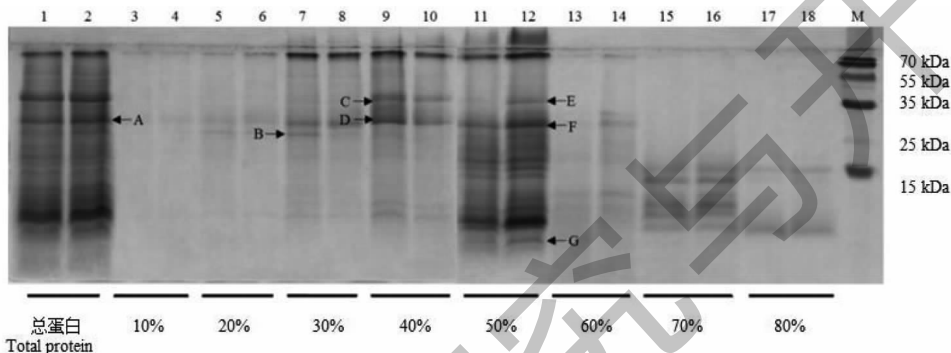


图 2 滇产及川产僵蚕酸溶性总蛋白质指纹图谱及分级指纹图谱

Fig. 2 Total protein fingerprints and fractional fingerprints of acid soluble proteins of Bombyx Batryticatus from Yunnan and Sichuan
注:1,2:总蛋白质;3,5,7,9,11,13,15,17:滇产各分级处理样品;4,6,8,10,12,14,16,18:川产各分级处理样品;M:蛋白质分子量标准。下同。Note:1,2:Total protein;3,5,7,9,11,13,15,17:Sample treated in each grade from Yunnan;4,6,8,10,12,14,16,18:Sample treated in each grade from Sichuan;M:Protein marker. The same below.

2.3 碱溶性蛋白质分级指纹图谱及差异分子研究

以 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.6)缓冲液提取两地僵蚕药材的碱溶性总蛋白质,并对其进行 SDS-PAGE 指纹图谱分析,结果表明两者相似度极高,条带覆盖严重,难以据此进行产地鉴定(图 3 第 1、2 泳道)。对碱溶性总蛋白质进行分级处理,再对所得各分级样品进行 SDS-PAGE 指纹图谱分析,结果表

明 10% ~ 30% 的丙酮溶液可以沉淀出分子量在 30 kDa 以上的蛋白质,40% ~ 60% 的丙酮溶液可以沉淀出分子量在 6 ~ 40 kDa 的蛋白质,70% ~ 80% 的丙酮溶液可以沉淀出分子量在 15 kDa 以下的蛋白质(图 3 第 3 ~ 18 泳道)。同时分级指纹图谱对比分析表明,两种样品存在 36.96 kDa 高丰度差异蛋白质条带(图 3 箭头 H 所示)。

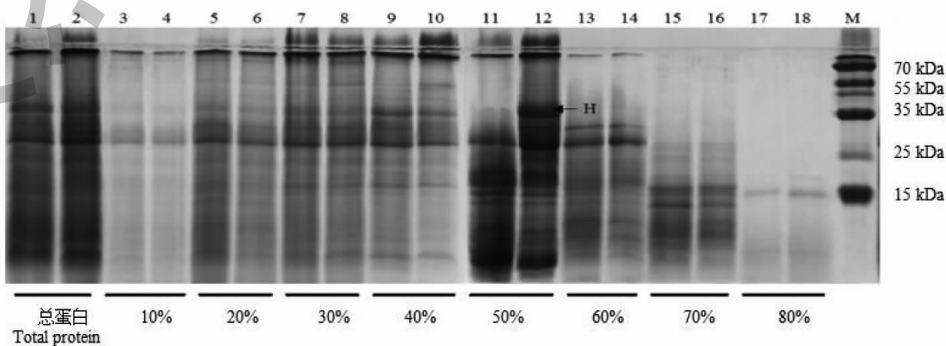


图 3 滇产及川产僵蚕碱溶性总蛋白质指纹图谱及分级指纹图谱

Fig. 3 Total protein fingerprints and fractional fingerprints of alkaline-dissolved proteins of Bombyx Batryticatus from Yunnan and Sichuan

2.4 水溶性蛋白质分级指纹图谱及差异分子研究

以 ddH₂O 提取两地僵蚕药材的水溶性总蛋白质,并对其进行 SDS-PAGE 指纹图谱分析,结果表明两者相似度极高,难以据此进行产地鉴定(图 4 第 1、2 泳道)。对水溶性总蛋白质进行分级处理,再对所得各分级样品进行 SDS-PAGE 分级指纹图谱分析,结果表明,10%~30%的丙酮溶液可以分级沉淀

出分子量在 25 kDa 以上的蛋白质,40%~60%的丙酮溶液可以分级沉淀出分子量在 6~35 kDa 的蛋白质,70%~80%的丙酮溶液可以分级沉淀出分子量在 15 kDa 以下的蛋白质(图 4 第 3~18 泳道)。同时分级指纹图谱对比分析表明,两种样品存在 6.84、17.62、51.32 kDa 差异蛋白质条带(图 4 箭头 I、J、K 所示)。

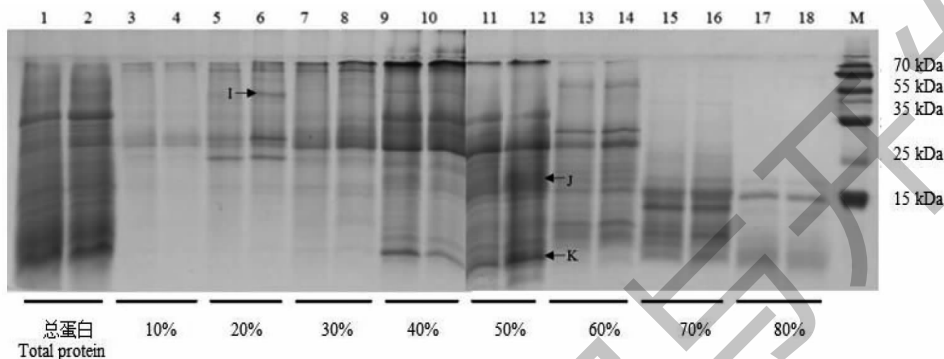


图 4 滇产及川产僵蚕水溶性总蛋白质指纹图谱及分级指纹图谱

Fig. 4 Total protein fingerprints and fractional fingerprints of water-dissolved proteins of *Bombyx Batryticatus* from Yunnan and Sichuan

2.5 醇溶性蛋白质分级指纹图谱及差异分子研究

以 40% EtOH 溶液提取两地僵蚕药材的醇溶性总蛋白质,并对其进行 SDS-PAGE 指纹图谱分析,结果表明两者相似度极高,难以据此进行产地鉴定(图 5 第 1、2 泳道)。对醇溶性总蛋白质进行分级处理,再对所得各分级样品进行 SDS-PAGE 指纹图谱分析,结果表明,10%的丙酮溶液可以分级沉淀出

分子量在 30 kDa 附近的蛋白质,20%~50%的丙酮溶液可以分级沉淀出分子量在 6~36 kDa 的蛋白质,60%~80%的丙酮溶液可以分级沉淀出分子量在 20 kDa 以下的蛋白质(图 5 第 3~18 泳道)。同时分级指纹图谱对比分析表明,两种样品存在 6.51、29.19、30.06、31.45、36.57、36.72 kDa 差异蛋白质条带(图 5 箭头 L、M、N、O、P、Q 所示)。

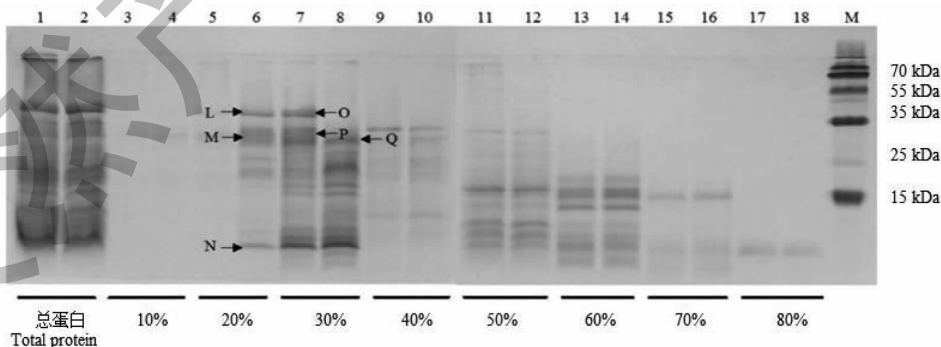


图 5 滇产及川产僵蚕醇溶性总蛋白质指纹图谱及分级指纹图谱

Fig. 5 Total protein fingerprints and fractional fingerprints of ethanol-dissolved proteins of *Bombyx Batryticatus* from Yunnan and Sichuan

2.6 LC-MS/MS 分析

切取包含差异蛋白质条带的凝胶,胶内酶解后进行 LC-MS/MS 分析,得总离子流图(见图 6),共计

得到 7 593 个谱图,2 238 个肽段,ProteinPilot 数据库检索及匹配分析共得到 273 个差异蛋白质分子,其中主要差异蛋白质见表 1。

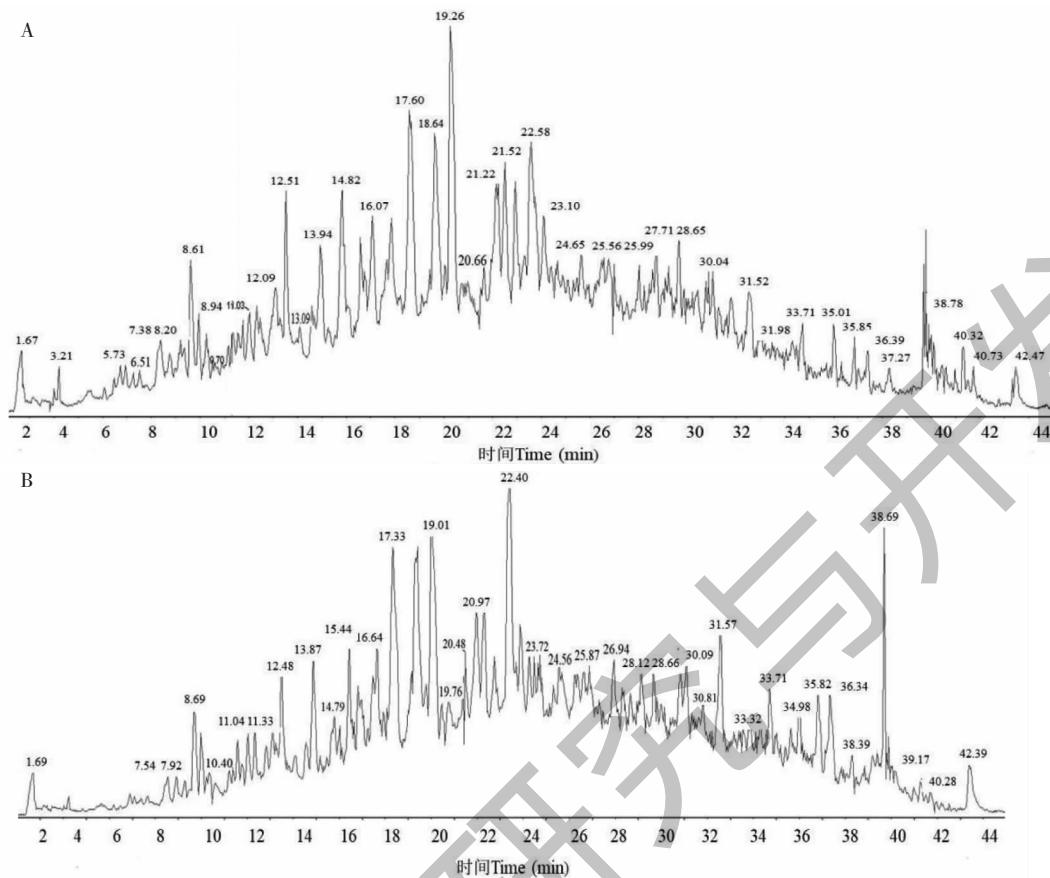


图6 僵蚕总离子流图

Fig. 6 Total ion chromatograms of Bombyx Batryticatus

注:A:滇产僵蚕;B:川产僵蚕。Note:A:Bombyx Batryticatus from Yunnan;B:Bombyx Batryticatus from Sichuan.

表1 滇产及川产僵蚕主要差异蛋白质

Table 1 Major differential proteins in Bombyx Batryticatus from Yunnan and Sichuan

登录号 Login number	蛋白质名称 Protein name	分子量 Molecular weight (kDa)	蛋白质匹配度 Protein matching degree(%)
A0A2N6NPF4	β -葡萄糖苷酶 β -Glucosidase	97.672	12.91
H9JPA8	含肽酶S1域的蛋白 Peptidase S1 domain-containing protein	97.068	1.69
A0A2N6NDP1	柠檬酸合酶 Citrate synthase	51.73	29.94
A0A2N6N8K2	二甲基硫醚单加氧酶 Dimethyl-sulfide monooxygenase	50.772	15.43
A0A2N6POH6	腺苷同型半胱氨酸酶 Adenosylhomocysteinase	48.791	29.62
A0A2N6P2K1	柠檬酸合酶 Citrate synthase	46.258	2.87
Q03383	抗胰蛋白酶1 Antichymotrypsin-1	44.572	60.00
H91WG3	CN水解酶结构域蛋白 CN hydrolase	44.322	44.25
P22922	抗胰蛋白酶(AT) Antitrypsin (AT)	43.499	82.91
H91XK0	抗胰凝乳蛋白酶1 Antichymotrypsin-1	41.919	70.82
H9JKA2	抗胰凝乳蛋白酶2 Antichymotrypsin-2	37.746	79.82
H9IZI5	含脂肪酶结构域的蛋白质 Lipase domain-containing protein	35.804	12.35
H9JTD0	含肽酶S1域的蛋白 Peptidase S1 domain-containing protein	35.629	10.87

续表 1 (Continued Tab. 1)

登录号 Login number	蛋白质名称 Protein name	分子量 Molecular weight (kDa)	蛋白质匹配度 Protein matching degree(%)
A0A2N6NPJ6	延胡索酰乙酰乙酸水解酶结构域蛋白 2 Fumarylacetoacetate hydrolase domain-containing protein 2	30.567	18.37
E7DWR1	甘露醇脱氢酶 Mannitol dehydrogenase	28.25	13.91
H9JKH3	含肽酶 S1 域的蛋白 Peptidase S1 domain-containing protein	28.154	11.28
A0A2N6NQC5	细胞壁甘露糖蛋白 1 Cell wall mannoprotein 1	26.262	43.82
A0A2N6NIP8	氰酸盐水合酶 Cyanate hydratase (Cyanase)	17.685	15.57
H9JDV4	核苷二磷酸激酶 Nucleoside diphosphate kinase	17.182	81.70
H9JHL4	含有细胞色素 c 结构域的蛋白 Cytochrome c domain-containing protein	11.721	20.37

2.7 生物信息学分析

对差异蛋白质分析进行 GO 概念注释分析(见图 7),结果表明主要涉及细胞过程(20.87%)、代谢过程(19.59%)、应答刺激(9.92%)、生物学调控(9.92%)、发育过程(6.62%)等生物过程;其中 52.04% 位于胞内细胞器,16.33% 位于细胞外表面,9.18% 位于外囊状结构,6.12% 位于包膜;主要涉及

催化活性(57.86%)、结合活性(28.57%)、抗氧化活性(5.71%)、分子功能调节活性(5.00%)、结构分子活性(2.86%);特别是过氧化氢酶(30.77%)、硫氧还蛋白过氧化物酶(15.38%)、维生素 B6 结合(15.38%)、几丁质类角质层(7.69%)、几丁质结合(7.69%)等活性。

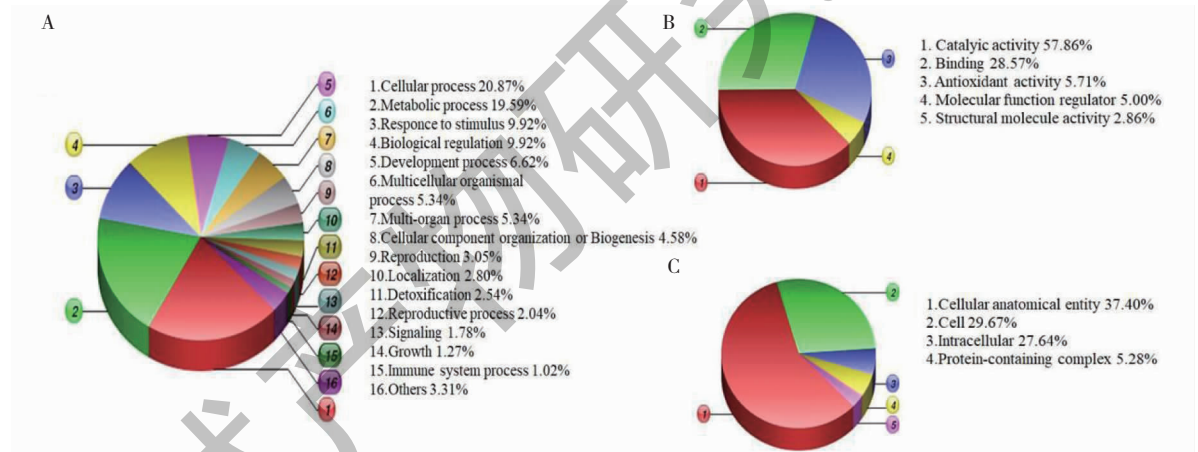


图 7 差异蛋白质分子 GO 功能注释结果

Fig. 7 GO function annotation results of different protein molecules

注:A:生物过程分析;B:细胞组成分析;C:分子功能分析。Note:A:Biological process;B:Cellular process;C:Molecular function.

KEGG 通路富集分析发现 69、38、30、28 个差异蛋白质分子分别与代谢性途径、次生代谢产物合成、不同环境下微生物代谢、抗生素生物合成相关。COG 分析表明其中 25.78% 为碳水化合物运输及代谢相关,23.83% 与翻译后修饰/蛋白质周转/伴侣蛋白相关,9.77% 与氨基酸运输及代谢相关,5.08% 与防御机制相关,14.84% 为功能未知的新蛋白(见图 8)。

研究表明僵蚕形成过程中,白僵菌首先通过分生孢子膨大发芽以直接穿透表皮而感染家蚕,在入

侵家蚕体壁和血腔之初分泌大量的胞外蛋白酶,家蚕因而发生相应的防御反应,通过表达高水平的蛋白酶抑制剂以响应白僵菌入侵^[7-9]。本文结果表明滇产与川产僵蚕的抗胰凝乳蛋白酶、抗胰蛋白酶等因子的表达水平均存在显著差异,有望用作产地鉴定的分子依据。此外,酪氨酸降解途径为动植物体内非常重要的代谢途径,其中断会引起严重的代谢紊乱,延胡索酰乙酰乙酸水解酶为该途径的末端限速酶^[10]。本文结果也表明该酶也有望用作产地鉴定的分子依据。

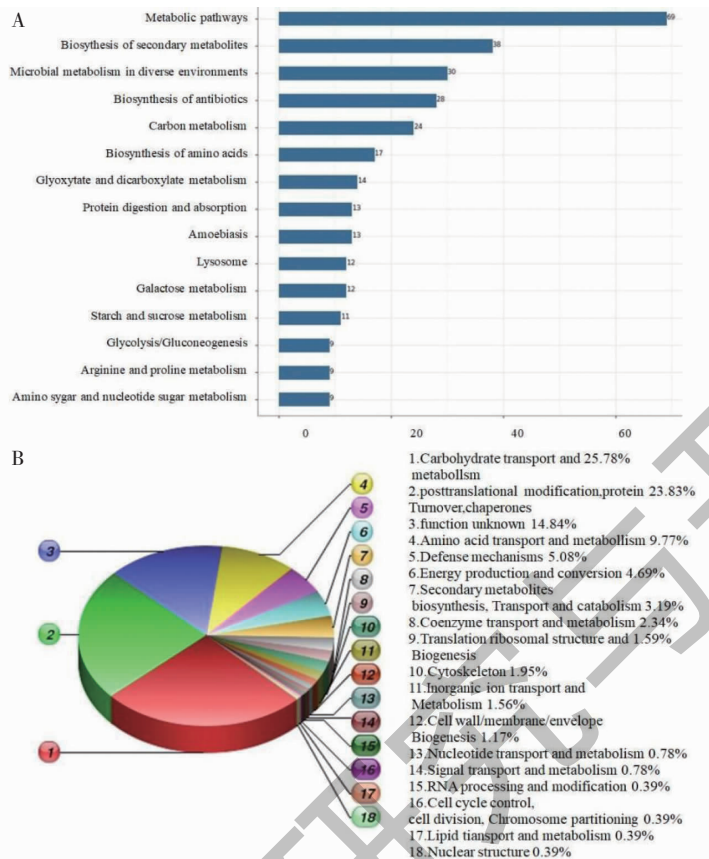


图8 差异蛋白质分子 KEGG 及 COG 分析结果

Fig. 8 Analysis results of KEGG and COG

注:A:KEGG 分析;B:COG 分析。Note:A:KEGG analysis;B:COG analysis results.

3 讨论与结论

本文提取了滇产与川产僵蚕的酸溶、碱溶、水溶、醇溶性蛋白质,并分别进行总蛋白质及分级指纹图谱研究,结果表明两种僵蚕的总蛋白质指纹图谱相似度很高,难以据此进行产地鉴定;两种僵蚕的分级指纹图谱则有显著差异,有望用于产地鉴定;分级指纹图谱提供信息的丰富程度依次为醇溶性蛋白质 > 酸溶性蛋白质 > 水溶性蛋白质 > 碱溶性蛋白质。依据分级指纹图谱差异共发现 β -葡萄糖苷酶、抗胰凝乳蛋白酶、抗胰蛋白酶、含脂肪酶结构域蛋白等 273 种特征蛋白质分子,这些分子具有转移酶、过氧化氢酶、硫氧还蛋白过氧化物酶等活性,参与多种细胞过程、代谢过程、应答刺激、生物学调控及发育过程,涉及次生代谢产物合成、不同环境下微生物代谢、抗生素生物合成、生物防御机制等途径,体现了不同生境因子对家蚕-白僵菌互作及僵蚕形成具有重要影响,具有用于僵蚕产地鉴定的潜在价值。

道地药材是中药学中控制药材质量的一项独具

特色的综合判别标准,深刻反映了中药材质量与其产地密切相关^[11,12]。建立科学的产地鉴定方法可以为中药材市场监管提供重要的技术支撑。杨健、张洪坤、宋君等分别依据稳定同位素、矿物元素指纹及 DNA 条形码进行了铁皮石斛、知母、黑木耳的产地鉴定研究^[13-15]。分子生药研究表明,产地对中药材质量的影响是由于温度、湿度、光照等生境因子的改变并对相关基因的表达发生影响来实现的。蛋白质为基因表达的产物,生境因子的改变也必然影响其表达种类与表达丰度,因而其在产地鉴定中的应用前景值得关注。本文结果表明,云南与四川的不同生境因子对两地所产僵蚕的蛋白质表达有显著影响,利用分级指纹图谱可以检出相应差异。与 SDS-PAGE 及二维凝胶电泳技术相比,分级指纹图谱技术首先将样品用丙酮处理,使其按疏水性强弱进行分级,再将相似样品放在同一张凝胶对比,具有操作简便、分辨率较高、结果准确、重现性高的优点,为其他中药材的产地鉴定研究提供参考。此外,僵

蚕醇溶性蛋白质中没有显著高丰度分子,构建分级指纹图谱时可以避免条带之间的相互干扰及覆盖,可以提供比其他种类蛋白质更为丰富的指纹图谱信息及更好的分辨率,上述结果也为其他中药材产地鉴定相关分子的选择提供思路。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing; China Medical Science Press, 2020: 392.
- 2 Wen CW, Shi L, Zhao YQ, et al. Herbal textual research on origin and development of *Bombyx Batryticatus* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药)*, 2017, 28: 171-173.
- 3 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing; China Medical Science Press, 1964: 313.
- 4 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing; China Medical Science Press, 1978: 643.
- 5 Liao BS, Song JY, Xie CX, et al. Study on traceability system of genuine medicinal materials [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2014, 39: 3881-3888.
- 6 Wen CW, Mao CY, Hu PP, et al. Quantitative determination of lysozyme by tricine protein electrophoresis [J]. *Jiangsu Agric Sci (江苏农业科学)*, 2012, 40: 290-292.
- 7 Vilcinskis. Coevolution between pathogen-derived proteinases and proteinase inhibitors of host insects [J]. *Virulence*, 2010, 1: 206-214.
- 8 Li YS, Liu HW, Zhu R, et al. Protease inhibitors in *Bombyx mori* silk might participate in protecting the pupating larva from microbial infection [J]. *Insect Sci*, 2016, 23: 835-842.
- 9 Li YS, Zhao P, Liu SP, et al. A novel protease inhibitor in *Bombyx mori* is involved in defense against *Beauveria bassiana* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2012, 42: 766-775.
- 10 Jiang YH, Zhu Q, Yang H, et al. Phenylalanine suppresses cell death caused by loss of fumarylacetoacetate hydrolase in *Arabidopsis* [J]. *Sci Rep*, 2022, 12: 13546-13546.
- 11 Chen DK, Li ZL, Yang L, et al. Chemical compositions and content variation of *Dendrobium officinale* from different habitats based on UPLC-QTOF-MS [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2022, 34: 614-622.
- 12 Li ZY, Liu XX, Feng YW, et al. Study on quality evaluation of *Lobelia chinensis* Lour. from different habitats based on HPLC fingerprint and content determination [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2023, 35: 1-12.
- 13 Yang J, Wu H, Lv CG, et al. Geographical origin discriminant of *Dendrobium officinale* based on stable isotope ratios [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2018, 43: 1118-1123.
- 14 Zhang HK, Huang YY, Pan LY, et al. Application of multi-element fingerprints in the study of origin traceability of *Anemarrhena Rhizoma* [J]. *China Pharm (中国药师)*, 2018, 21: 61-65.
- 15 Song J, Wang D, Guo LA, et al. Traceability of agricultural products using DNA barcode: molecular traceability detection of *Auricularia auricula* origin [J]. *Chin J Anal Lab (分析试验室)*, 2014, 33: 292-295.