

文章编号: 1674-7054(2019)02-0204-04

海南菲牛蛭抗凝血酶成分的提取与 SDS-PAGE 电泳测定

何梦雪, 李泽友

(海南医学院药学院, 海口 571199)

摘要: 应用凝血酶滴定法, 比较不同提取方法的提取效率和不同相对分子质量的超滤膜对菲牛蛭抗凝血酶活性成分的分离作用, 并用 SDS-PAGE 电泳测定分离得到抗凝活性成分的相对分子质量。结果表明: 盐提取法更优于水提法、水提醇沉法和丙酮法; 用盐提法对菲牛蛭头部提取的抗凝成分活性达 $1\ 811.11\ \text{U} \cdot \text{g}^{-1}$, 选择 10×10^3 和 30×10^3 的超滤膜进行再次超滤得抗凝成分相对分子质量约为 15.96×10^3 。

关键词: 菲牛蛭; 抗凝活性; 膜分离; 海南

中图分类号: Q 814.1

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2019.02.017

菲牛蛭 *Poecilobdella manillensis* Lesson 俗称“金边蚂蟥”, 别名马尼拟医蛭, 为医蛭科牛蛭属动物, 与《中国药典》记载的水蛭品种中的日本医蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 同属医蛭科不同属的吸血蛭类品种。菲牛蛭在国内主要分布于广东、广西、福建、海南、云南和香港等地区^[1], 尤以海南温度适宜养殖, 是南方水蛭的代表性品种, 分别被收录进《广西中药材标准》《云南省中药材标准》^[2]。自 1992 年 STEINER 等首次从菲牛蛭中提取到菲牛蛭素以来, 菲牛蛭的抗凝血活性成为了研究的热点^[3-4]。菲牛蛭具有抗凝血、抗血栓、降血脂、抗肿瘤等药理作用, 具有较好的临床应用前景, 其主要活性成分是水蛭素类和一些其他的生物活性成分, 如抗凝多肽, 蛋白酶抑制剂 Gelin, 透明质酸酶等, 其中水蛭素类抗凝成分主要存在于菲牛蛭头部^[5]。除了活性成分外, 菲牛蛭的化学成分还包括多种氨基酸、脂肪酸及微量元素等^[7-8]。目前, 国内市场上作为中药药源动物的水蛭主要为宽体金线蛭和菲牛蛭^[9]。海南菲牛蛭资源较多, 笔者以海南菲牛蛭为原料, 研究不同提取方法和不同相对分子质量膜分离的活性情况, 为海南菲牛蛭的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器 DW-86L490 超低温冰箱(青岛海尔), ALPHA 1-2 LO plus 真空冷冻干燥机(德国 CHRIST 公司), LYSF-200-B 粉碎机(长沙卓成), KUBOTA 5922 离心机(日本久保田), DYY-42 型电泳仪(北京六一), 恒温水浴锅(常州国华), SPECTRA MAX 190 酶标仪(美谷分子), WT-B 2003 电子天平(杭州万特), Tanon 凝胶成像系统。

1.2 实验材料 海南菲牛蛭由海南利器思生物科技有限公司提供; 凝血酶(批号: P22M8Y32107)、纤维蛋白原(批号: P16A9Y58888)均为上海源叶生物科技有限公司生产; 预染蛋白 Marker(赛默飞世尔科技有限公司), 考马斯亮蓝快速染色液、Bardford 蛋白浓度测定试剂盒均为上海碧云天生物技术有限公司生产; 氯化钠(广州化学试剂厂), 丙酮、乙醇(西陇科学有限股份公司), 过硫酸铵(天津市百世化工有限公司), 15 mL Millipore Amicon Ultra 超滤离心管(默克生命科学部), 蒸馏水(自制)。

收稿日期: 2019-03-20

修回日期: 2019-05-22

作者简介: 何梦雪(1993-), 女, 海南医学院药学院 2016 级硕士研究生. E-mail: iophmx123@qq.com

通信作者: 李泽友(1973-), 男, 教授, 博士, 硕士生导师. 研究方向: 药物活性成分与质量控制. E-mail: lzy7307@126.com

1.3 实验预处理 将活菲牛蛭在室温下用蒸馏水充分清洗, -80°C 低温冰箱迅速冻死, 将其放置在 $-15^{\circ}\text{C} \sim -20^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中预冻 48 h, 至其周围的冰霜厚约 5 mm, 将其迅速放置于真空冷冻干燥设备中, 干燥 24 h。干燥后的菲牛蛭粉碎处理, 粉末过 80 目筛备用。另取菲牛蛭剪下头部, 单独粉碎, 备用。

1.4 抗凝血酶活性检测 按 2015 年版中国药典中凝血酶滴定法^[10]操作。单位质量抗凝活性计算:

$$U = (C_1 V_1 / C_2 V_2),$$

式中: U —每 1 g 含抗凝血酶活性单位($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$); C_1 —凝血酶溶液的质量浓度($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$); C_2 —供试品溶液的质量浓度($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); V_1 —消耗凝血酶溶液的体积(μL); V_2 —供试品溶液的加入量(μL)。

1.5 抗凝成分的提取 分别按经典水提醇沉法^[8]、盐提法^[10]、水提法^[11]、丙酮法^[12]提取, 按 1.4 抗凝血酶活性检测的方法检测。

1.6 抗凝成分的分离 分别选用 3×10^3 , 10×10^3 , 30×10^3 3 个相对分子质量的超滤管, 按 1.5 抗凝成分提取的最优方法, 25°C , 7 500 g 离心至超滤管内管沉淀无溶液, 按 1.4 抗凝血酶活性检测的方法检测。

1.7 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE) 电泳仪进行不连续电泳, 凝胶厚度为 1.5 mm, 分离胶 $T = 15\%$; 浓缩胶 $T = 5\%$ 。取分离得到的样品 3 μL , 分别与 12 μL 样品缓冲液($5\times$)混合, 再与处理过的预染蛋白 Marker 一起上样。80 V 电泳约 30 min 后, 120 V 电泳至结束。电泳后利用甲醇—乙酸固定, 考马斯亮兰快速染色液染色, 脱色, 凝胶成像系统扫描记录电泳结果。

2 结果与分析

2.1 提取方法的选择 不同提取方法所得菲牛蛭粉末的抗凝活性结果见表 1。由表 1 可见, 除丙酮法外, 其余 3 种提取方法均有不同的抗凝血酶活性。其中水提法和盐提法抗凝活性相近, 差异不显著($P > 0.05$)。另外, 取头部位粉末采用盐提法测得抗凝血酶活性为 $1\,811.11 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

表 1 不同提取方法抗凝血酶活性的测定结果

Tab. 1 Antithrombin activities of the extracts extracted by different methods

粗提方法 Extraction method	质量/g Weight	溶剂倍数 Folds of solution	凝血酶消耗量/ μ LAntithrombin consumption	抗凝活性/($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$) Anticoagulant activity
水提法	0.501	8	54	173.89 ± 23.30^b
盐提法	0.500	5	86.67	173.45 ± 10.09^b
水提醇沉法	0.499	5	20.67	41.34 ± 2.46^c
丙酮法	0.500	4	—	—
菲牛蛭头部盐提法	0.500	5	181.11	$1\,811.11 \pm 33.30^a$

注: 1) 抗凝活性数据由平均值 $\pm$ 标准差表示; 右上方字母不同表示有显著性差异($P < 0.05$)。2) 丙酮法未检测出活性

Note: 1) The results of anticoagulant activity are expressed as mean $\pm$ SD; different letters on the upper right of anticoagulant activity indicate significant differences ($P < 0.05$). 2) The solution extracted by acetone has no anticoagulant activity

2.2 抗凝血酶成分的分离 抗凝活性测定结果见图 1。由图 1-A 可知: 3×10^3 膜截留部位活性最高, 10×10^3 膜截留部位次之, 3×10^3 膜滤过部位活性最低。将 30×10^3 膜滤过部位平均分成 2 份, 再分别用 10×10^3 和 3×10^3 膜超滤得相对分子质量在 $10 \times 10^3 \sim 30 \times 10^3$ 部位与相对分子质量在 $3 \times 10^3 \sim 30 \times 10^3$ 部位; 将 10×10^3 膜滤过部位再次用 3×10^3 膜超滤得相对分子质量在 $3 \times 10^3 \sim 10 \times 10^3$ 截留部位, 测定抗凝活性结果如图 1B: 即相对分子质量 $3 \times 10^3 \sim 30 \times 10^3$ 截留部位活性与相对分子质量在 $10 \times 10^3 \sim 30 \times 10^3$ 活性相近, 差异不显著($P > 0.05$), 最低为相对分子质量 3×10^3 滤过部位。

2.3 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE) 超滤后所得溶液 SDS-PAGE 电泳结果见图 2。由图 2 可知, 除 3×10^3 滤过部位无条带外, 其余溶液均有蛋白条带出现, 其中粗提原液、 3×10^3 截留部位、 10×10^3 截留部位、 30×10^3 截留部位蛋白条带较多。 10×10^3 滤过及 30×10^3 滤过部位均只有 1 条蛋白条带出现, 呈现电泳纯状态, 且 30×10^3 滤过部位电泳显示较明显。

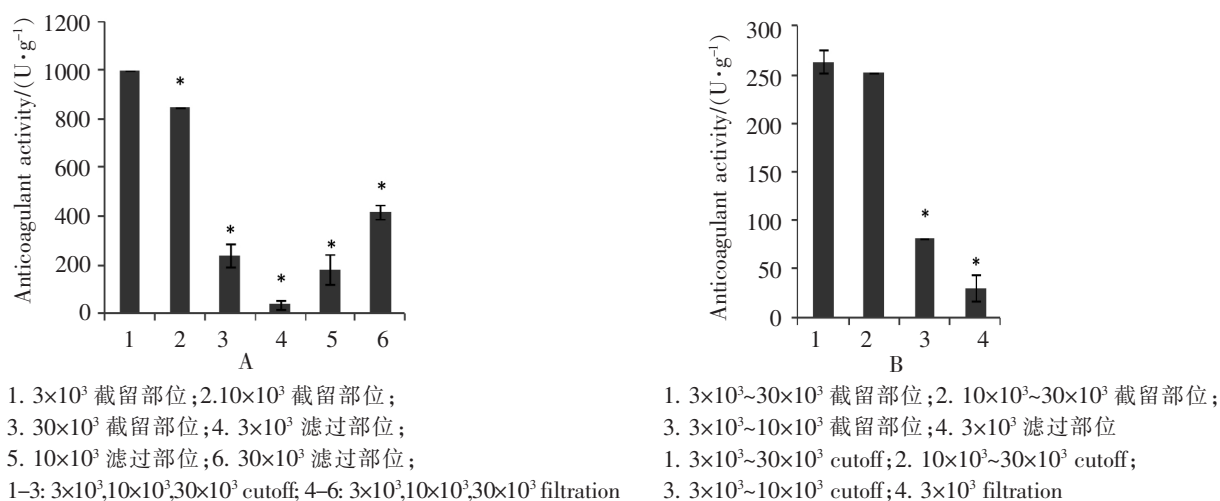


图1 不同相对分子质量超滤膜 1 次(A)、2 次(B)超滤抗凝活性的测定结果

图中* 表示极显著性差异($P < 0.01$)

Fig. 1 Anticoagulant activity of the extract purified once (A), twice (B) by ultra-membrane with different molecular weights

* means significant differences ($P < 0.01$)

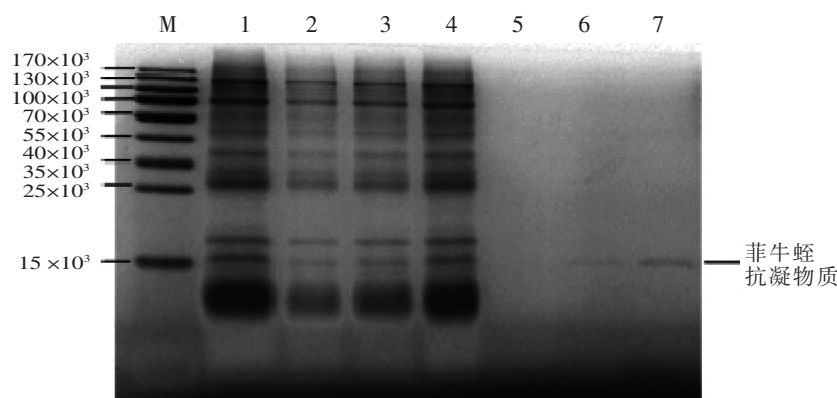


图2 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 2 SDS-PAGE electrophoretic analysis

M: Thermo 26616 marker; 1: Original extract solution; 2-4: $3 \times 10^3, 10 \times 10^3, 30 \times 10^3$ cutoff;

5-7: $3 \times 10^3, 10 \times 10^3, 30 \times 10^3$ filtration

以 x 代表迁移率 R_f , y 代表相对分子质量 MW 的对数(表 3), 绘制标准曲线, 得到回归方程为: $y = -1.7002x + 2.0412$, $r = 0.9963$ 。菲牛蛭抗凝活性物质的 R_f 值为 0.49, 由回归方程计算出相对分子质量约为 15.96×10^3 。

3 讨论

以干燥菲牛蛭粉末为原料, 选取了文献中抗凝活性较高的几种提取方法加以考察。本实验中水提法与盐提法的抗凝活性较高, 结果与欧兴长一致^[1], 由于水提法与盐提法的抗凝活性差异不显著, 考虑到盐提法无需加热、溶剂用量少且节省时间, 故而选择盐提法进行粗提取。本实验中, 海南菲牛蛭中抗凝血活性最大的虽为 3×10^3 以上的相对分子质量部位, 但与其 10×10^3 以上相对分子质量部位活性相差较小, 说明 $3 \times 10^3 \sim 10 \times 10^3$ 部位抗凝活性物质较少, 且 3×10^3 以上与 10×10^3 以上部位的抗凝活性均远大于相对分子质量 30×10^3 以上部位的抗凝活性, 可认为本实验中海南菲牛蛭抗凝血活性物质的相对分子质量主要集中在 $10 \times 10^3 \sim 30 \times 10^3$; 这与再次超滤的结果相吻合, 也与 SDS-PAGE 电泳图中分离得到的相对分子质量约为 15.96×10^3 结果相符。

SDS-PAGE 电泳图中粗提原液与 3×10^3 , 10×10^3 , 30×10^3 超滤膜超滤后的蛋白条带数量差别不大, 同时 10×10^3 以下滤过部位出现了大于 10×10^3 的条带, 可能因为进行膜截留相对分子质量测定的参照物没有具体标准, 线性 and 球形都可以, 难以确定, 因而截留相对分子质量值仅能作为选择的相对标准^[12], 故膜分离只能起到粗分效果, 在实际应用中后续还需采取进一步的分离。本实验海南菲牛蛭电泳纯抗凝物质相对分子质量约为 15.96×10^3 , 与文献报道的相对分子质量为 7×10^3 ^[3] 的水蛭素不同, 与菲牛蛭素 BDA(15.2×10^3), BDB(14.6×10^3)^[8] 的相对分子质量较为接近。

采用盐提法及选用 10×10^3 及 30×10^3 膜分离可实现海南菲牛蛭中抗凝成分的初步分离, 得到抗凝成分相对分子质量为 15.96×10^3 , 且此方法的实验操作简单, 实验条件要求较温和。

参考文献:

- [1] 周维官, 周维海, 关建聪, 等. 菲牛蛭的研究进展 [J]. 广西科学院学报, 2010, 26(1): 74-77.
- [2] 潘雪, 严亚萍, 林亚明. 菲牛蛭近 20 年的研究进展 [J]. 中西医结合研究, 2015, 7(4): 216-218.
- [3] STEINER V, KNECHT R, BOERNSEN K O, et al. Primary structure and function of novel O-glycosylated hirudins from the leech *Hirudinaria manillensis* [J]. Biochemistry, 1992, 31(8): 2294-2298.
- [4] 方富永, 苗艳丽, 刘惠钦, 等. 以 D2EHPA 为流动载体的乳状液膜萃取菲牛蛭中的水蛭素实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(20): 3056-3061.
- [5] 方富永, 苗艳丽, 苏舒华, 等. 双水相萃取-凝胶色谱联用法提取菲牛蛭中的水蛭素 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(7): 489-494.
- [6] 黄爱民, 黎肇炎, 廖共山, 等. 菲牛蛭素体内外抗凝实验研究 [J]. 广西医科大学学报, 2006, 23(1): 30-32.
- [7] 冯旭, 孔维军, 杨美华, 等. 菲牛蛭的药理作用及其机制研究进展 [J]. 中南药学, 2013, 11(10): 750-753.
- [8] 卢舒凡, 李庆国, 许淑芹. 广东菲牛蛭中有效抗凝物质的分离纯化 [J]. 医学研究杂志, 2014, 43(5): 104-107.
- [9] 杨谋, 张选杰, 张娇, 等. 水蛭的药用价值和养殖现状 [J]. 当代畜牧, 2018(18): 58-60.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015年版) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 83-84.
- [11] 欧兴长, 张秋海, 丁家欣, 等. 四种水蛭抗凝血酶作用的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 1996, 8(2): 54-56.
- [12] 陈志伟. 超滤技术在蛋白质分离纯化中的应用 [J]. 科技经济导刊, 2017(24): 106, 104.

Extraction and SDS-PAGE Electrophoresis of Anticoagulant Components from *Poecilobdella manillensis* Lesson in Hainan

HE Mengxue, LI Zeyou

(School of Pharmaceutical Sciences, Hainan Medical University, Haikou, Hainan 571199, China)

Abstract: To study the anticoagulant activity and purify the anticoagulation components from *P. manillensis* in Hainan. *Poecilobdella manillensis* Lesson collected in Hainan was extracted with different extraction methods and purified with molecular weight ultra membranes to determine its anticoagulant components and activities by using the thrombin titration method. The relative molecular weight of the anticoagulant components was calculated by using the SDS-PAGE test. The results showed that the sodium chloride solution was better than the water extraction, the water extraction and alcohol precipitation, and the acetone extract in extraction of anticoagulant components. The anticoagulant activity of the extract from the head of *P. manillensis* extracted by the sodium chloride solution was $1\ 811.11\ \text{U} \cdot \text{g}^{-1}$, the highest among the other extraction methods. The ultra-membranes with molecular weights of 10×10^3 and 30×10^3 were selected for purification, and the molecular weight of the purified protein was 15.96×10^3 .

Keywords: *Poecilobdella manillensis*; anticoagulant activity; membrane separation; Hainan

(责任编辑: 叶 静)