

广东眼镜蛇毒低分子量多肽的分离纯化与性质鉴定

郝彩^{1,2}, 韩丽萍^{2*}, 蒋琳兰², 江伟健² (1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006; 2. 广州军区广州总医院药剂科, 广州 510010)

摘要: 目的 从广东眼镜蛇粗毒中分离纯化出色谱纯的低分子量多肽并对其部分性质进行鉴定。方法 采用化学沉淀法对蛇粗毒进行预处理, 经 Sephadex G-50 凝胶过滤和 UND Sphere S 阳离子交换层析得到高纯度低分子量多肽, 用 SDS-PAGE 及 HPLC 对产物纯度进行鉴定, 并用 SDS-PAGE 和质谱法测定分子量, 采用蛙心灌流法考察产物是否具有心脏毒性。结果 结果表明, 经分离纯化后得到两种低分子量多肽 GI2 和 GI3, 均为单一组分, 可达到色谱纯, SDS-PAGE 法测得 GI2 分子量为 14 300 Da, 质谱法测得 GI3 分子量为 6 725.8 Da, 仅 GI2 具有心脏毒性, 收率分别为 9.5% 和 10.1%。结论 通过化学沉淀预处理, 并经 2 次柱色谱可从广东眼镜蛇毒中分离得到两种色谱纯的低分子量多肽, 且收率较高。

关键词: 眼镜蛇毒; 低分子量多肽; 纯化; 神经毒素; 心脏毒素; 鉴定

中图分类号: R284.2; R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)05-0383-04

Purification and Characterization of Low Molecular Weight Polypeptides from the Venom of Guangdong Cobra (*Naja Naja Atra*)

HAO Cai^{1,2}, HAN Liping^{2*}, JIANG Linlan², JIANG Weijian² (1. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China; 2. Department of Pharmacy, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To isolate and characterize some properties of the chromatographically pure low molecular weight polypeptides from the venom of Guangdong cobra (*Naja naja atra*). **METHODS** Isolation and purification were carried out by chromatography on Sephadex G-50 and UND Sphere S column after the pretreatment by chemical precipitation. The purity of this product was determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and HPLC, and its molecular weight was observed by SDS-PAGE and mass spectrography. The cardiotoxicity of the polypeptides was investigated using the frog heart perfusion experiment. **RESULTS** After the chemical precipitation and Two-step column chromatography, the products, named 'GI2' and 'GI3', were single components. The molecular weight of GI2 is 14 300 Da observed by SDS-PAGE and GI3 is 6 725.8 Da determined by mass spectrography. The yields of the products were 9.5% and 10.1%, and only GI2 showed cardiotoxicity. **CONCLUSION** Two low molecular weight components could be obtained from the venom of Guangdong cobra after chemical precipitation and two-step column chromatographies, with high yield.

KEY WORDS: cobra venom; low molecular weight polypeptide; purification; neurotoxin; cardiotoxin; characterization

蛇毒是由蛇的毒液腺分泌出的一种天然毒蛋白, 含有多重蛋白质、多肽、酶类和其他小分子物质, 具有广泛的生物学活性, 是一种宝贵的生物药材^[1]。蛇毒低分子量多肽是其中具有药理学活性的

主要成分, 包括神经毒素和心脏毒素等。神经毒素是一类相对分子质量较小的碱性多肽, 可通过不同的方式改变中枢和周围神经系统正常的兴奋传递, 从而影响正常的神经活动, 可作为研究神经

基金项目: 全军医学科学技术研究“十一五”计划课题项目(06MA125)

作者简介: 郝彩, 女, 硕士生 Tel: 15913173427

E-mail: haocai323520@163.com

*通信作者: 韩丽萍, 女, 硕士, 主任药师

Tel: 13312863162

E-mail: hanliping@163.com

中国现代应用药学 2011 年 5 月第 28 卷第 5 期

Chin JMAP, 2011 May, Vol.28 No.5

• 383 •

系统中神经递质的产生及其传递过程分子机制的重要探针,也可用于治疗某些神经性疾病,而且还具有良好的镇痛作用,其镇痛作用具有效价高、无成瘾性、无赖药性等优点,作为一种新型的镇痛剂具有较大的开发价值^[2-3]。心脏毒素是一种单一、高度疏水的短链肽,一般由 60~63 个氨基酸组成,等电点多在 10 以上,可引起心肌、骨骼肌及平滑肌的去极化和挛缩,也能引起神经元的去极化和兴奋性的消失,可被用于多种分子过程的研究。另外,心脏毒素可对多种动物和人的肿瘤细胞起溶解作用,能破坏游离恶性肿瘤细胞,是一种很有潜力的抗肿瘤药物^[4-5]。

目前多种低分子量多肽已得到分离纯化,研究发现其种类与分布不仅与蛇的种类有关,而且具有明显的地域性差异^[6]。我国华南地区的毒蛇资源丰富,目前江西、浙江、福建及云南地区的眼镜蛇毒中的低分子量多肽已得到分离纯化及深入研究,但对广东地区眼镜蛇蛇毒神经毒素及心脏毒素的研究及报道较少,本研究采用化学沉淀法与现代层析技术相结合同时从广东产眼镜蛇毒中分离纯化出了两种低分子量多肽并对其部分性质进行了鉴定,研究发现该纯化方法不但可提高产物纯度而且可提高其回收率。

1 实验仪器与材料

1.1 仪器

BioLogic LP 层析仪、微型双垂直板电泳槽、恒压恒流电泳仪、Universal Hood II 凝胶成像系统(Bio-Rad 公司); Agilent 1100 高效液相色谱仪(Agilent 公司); BL420F 生物机能实验系统(成都仪器厂); Sigma1-15 高速低温离心机(Sigma 公司)。

1.2 试剂与材料

广东舟山眼镜蛇(*Naja naja atra*)蛇毒冻干粉(广州新源毒蛇养殖场提供,产地广东,批号:20081005,广州医学院蛇毒研究所鉴定,检验员:唐娅、崔超伟); Sephadex G-50 凝胶(Sigma 公司); 阳离子交换树脂 UND SphereTM S 为 Bio-Rad 公司产品; BCA 蛋白定量试剂盒为 Thermo Scientific 产品; 标准蛋白质(分子量 14.3~97.2 kDa) 为 TaKaRa Biotechnology 产品; 三氟乙酸(TFA)、乙腈为 Sigma 公司产品; 乙酸铵、氯化钠等均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 广东眼镜蛇毒低分子量多肽的分离纯化

广东眼镜蛇粗毒 200 mg,按照文献^[7]的方法

进行化学沉淀预处理,预处理液 3 mL 上 Sephadex G50(1.0 cm×120 cm)凝胶柱,用 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 7.2,含 NaCl 0.2 mol·L⁻¹)洗脱,流速:0.3 mL·min⁻¹,收集主峰 40 mL,再过 UND Sphere S 阳离子交换柱(1.6 cm×20 cm),用 0.05 mol·L⁻¹ 乙酸铵缓冲液(pH 5.8)及 NaCl(0~1.0 mol·L⁻¹)线性梯度洗脱,流速为 0.7 mL·min⁻¹,取各主峰浓缩、冻干,即得纯化的各种多肽。

眼镜蛇粗毒预处理后,经 Sephadex G50 凝胶层析,共得到 2 个主峰,根据电泳结果,其中峰 1 所含蛋白的分子量均在 25 kDa 以下,为目的蛋白峰。BCA 法测得蛋白浓度为 1.40 mg·mL⁻¹,收率约 28.0%,结果见图 1。

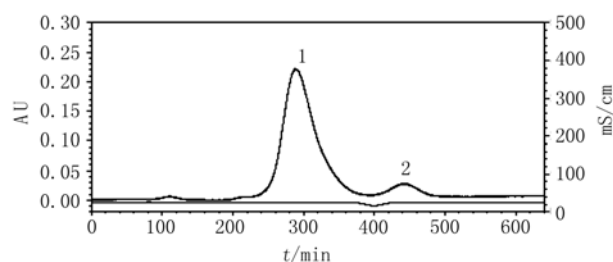


图 1 眼镜蛇粗毒凝胶过滤图谱

1, 2 为凝胶过滤分离得到的两个层析峰,其中峰 1 为低分子量多肽

Fig 1 Gel filtration of the crude venom of the snake *Naja naja atra*

Symbols 1, 2 separately denote the isolated chromatographic peaks, and peak 1 contains the low molecular weight polypeptides

对凝胶过滤峰 1 进行离子交换层析进一步分离纯化,得到 3 个主峰,分别命名为 GI1、GI2 和 GI3,经 SDS-PAGE 和 HPLC 鉴定,GI1 为溶剂峰,而 GI2 和 GI3 均为低分子量多肽。分别收集得到 32 mL 和 20 mL,BCA 法测的蛋白浓度为 0.59 mg·mL⁻¹ 和 1.01 mg·mL⁻¹,收率为 9.5 % 和 10.1 %。结果见图 2。

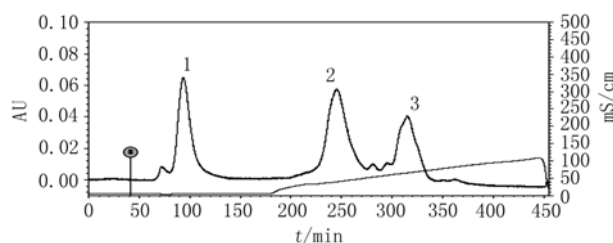


图 2 凝胶过滤峰 1 的离子交换层析图谱

1, 2, 3 分别为离子交换层析分离得到的三个层析峰,其中峰 2, 3 为低分子量多肽

Fig 2 Ion exchange chromatography of peak 1 from gel filtration

Symbols 1, 2, 3 separately denote the isolated chromatographic peaks, and peak 2 and 3 are the low molecular weight polypeptides.

2.2 纯度鉴定

2.2.1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法鉴定纯度 按文献[8]的方法,采用5%浓缩胶和15%分离胶,凝胶厚度0.75 mm,垂直板电泳,对收集的图1中的峰1和图2中的GI2、GI3进行电泳,上样量10 μg ,100 V 稳压电泳,当样品浓缩成一条直线时,改用200 V 稳压电泳,考马斯亮蓝 G-250 染色^[8]。

凝胶层析得到的峰1中含有3种成分,分子量分别约为25, 14, 7 kDa。结果见图3。

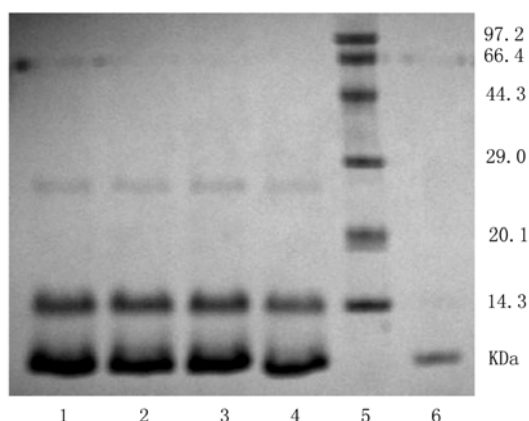


图3 凝胶过滤峰1的 SDS-PAGE 电泳图

1~4 为凝胶过滤峰1; 5 为蛋白 Marker; 6 为 GI3

Fig 3 SDS-PAGE of elutions of peak 1 of gel filtration

1-4 are eluate of peak 1 gel filtration; 5 is marker; 6 is eluate of GI3

经离子交换层析再次分离后,分子量不同的物质得到较好分离,对GI3进行离子交换层析后,仅有一个电泳条带,达到电泳纯。结果见图4。

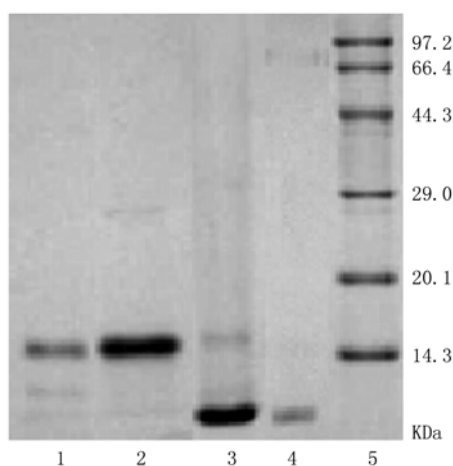


图4 GI2 和 GI3 的 SDS-PAGE 电泳图

1~2 为 GI2; 3~4 为 GI3; 5 为蛋白 Marker

Fig 4 SDS-PAGE of elutions of GI2 and GI3

1-2 are the eluate of GI2; 3-4 are the eluate GI3; 5 is marker

2.2.2 高效液相色谱法 固定相: Aglient TC-C₁₈

柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μm); 流动相: A 相为 0.1% 三氟乙酸溶液, B 相为乙腈, 梯度: 0~10 min, B 相为 10%, 10~50 min, B 相为 10% $\rightarrow$ 50%; 二极管阵列检测器, 检测波长 214 nm 和 280 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL ; 流速 1.0 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ 。在此条件下, GI2 和 GI3 的色谱图见图 5 和图 6。

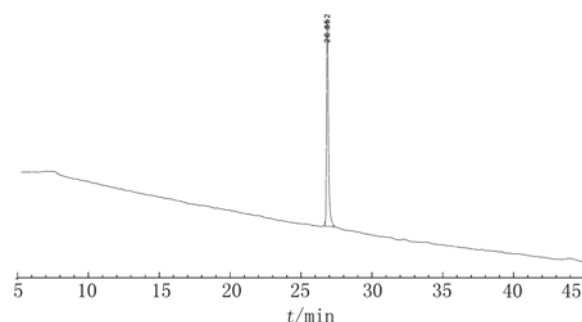


图5 GI2 高效液相色谱图

Fig 5 Purity of GI2 determined by HPLC

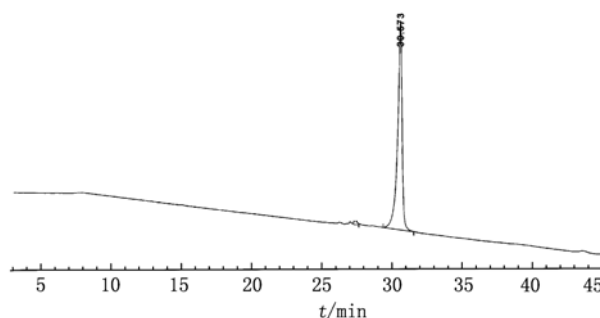


图6 GI3 高效液相色谱图

Fig 6 Purity of GI3 determined by HPLC

经两次阳离子交换层析后,GI2和GI3均达到色谱纯。GI2和GI3纯度分别为99.9%和99.5%。

2.3 分子量测定

采用 SDS-PAGE 法对 GI2 进行分子量测定,测定各标准蛋白的相对迁移率 R_m ,将标准蛋白质分子量的对数和 R_m 作图,并求出回归方程 $Y=1.957-1.449X$, $r=0.985$ 。根据 GI2 的相对迁移率求得该多肽的分子质量为 14 300 Da。

采用质谱法对 GI3 进行分子量测定,仪器为 AutoFlex MALDI-TOF-TOF-MS, Bruker, USA, 测试条件: N_2 光源, 波长 337 nm; 正离子; 线性方式(飞行管长 1.22 m, 加速电压 20 kV); 基质:CCA。质谱分析结果,分子量大小为 6 725.8 Da。

2.4 分离组分的活性鉴定

按徐叔云《药理实验方法学》中Straub法制备

离体蛙心标本,待心脏活动稳定,描记一段正常心脏活动曲线后,将各个组分溶液分别注入离体蛙心内,给药量1mL(100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),记录收缩幅度、心率的变化^[9]。GI2能使离体蛙心标本心肌收缩力短暂增强后迅速减弱、心脏挛缩,最后停搏于收缩期,主要表现为肌张力升高后显著下降,最终消失。因此该组分具有心脏毒性;GI3对离体蛙心无明显影响,可能为神经毒,但须进一步实验证实。

3 讨论

蛇毒中的成分极为复杂,含有数十种复杂的蛋白和多肽成分,包括多种心脏毒素(CTX)、神经毒素(NTX),酶类(如 PLA^2)及神经生长因子等物质。其中,CTX与NTX均为蛇毒三指蛋白(three-finger protein)家族,它们的化学性质十分相似,氨基酸序列高度同源,这三类蛋白的分子量分布在6.0~13.5 kDa,常规的凝胶过滤方法很难将它们分开。本研究采用化学试剂预处理,可以去除脂溶性成分和酸性或中性的 PLA^2 等杂蛋白,降低了整个层析过程的负荷,提高了后续工作效率,且产物具有较高的纯度和回收率,方法简便,适合于规模化生产。

SDS-PAGE和HPLC纯度鉴定结果显示GI2和GI3分别达到了电泳纯和色谱纯,为单一组分。在化学方法预处理后仅经两步柱层析(凝胶过滤和离子交换层析),产物纯度就可达到99.5%以上,可满足于制备各种制剂应用于临床。根据质谱结果,GI3的分子量为6725.8 Da,据文献报道^[10],短链突触后神经毒素和心脏毒素都是由60个左右的氨基酸残基组成,分子量范围在6000~8000 Da,因此GI3的这一特征与蛇毒中突触后神经毒素中毒性较弱的短链神经毒素以及心脏毒素相符,而蛙心灌流实验结果表明GI3不影响离体蛙心的正常收缩,不具有心脏毒性,因此推测其可能为神经毒素,但由于蛇毒中成分较为复杂,该推论还需要进一步实验证实。

GI2和GI3收率可达到粗毒的9.5%和10.1%,较一般文献中所述的高^[11-12],进一步证实本研究中所建立的分离纯化方法适用于该低分子量碱性多肽的分离。另外,低分子量碱性多肽的种类及分布不仅与蛇种有关,还具有一定的地域差异。

课题组同时考察了江西、云南、福建和湖南产眼镜蛇毒中该低分子量碱性多肽的含量,发现在广东产眼镜蛇毒中,此种低分子量碱性多肽含量和收率最高。

致谢: 本研究中低分子量多肽GI3的分子量测定工作由中科院上海生科院蛋白质组研究分析中心协助完成,在此表示感谢!

REFERENCES

- [1] CHEN K D, YANG M L. The advance on the studies and applications of the snake venoms [J]. J Snake(蛇志), 1997, 9(4): 47-50.
- [2] JOYCE SIEW P Y, GONG N L, FATEMAH A, et al. Snake postsynaptic neurotoxins: gene structure, phylogeny and applications in research and therapy [J]. Biochimie, 2004, 86(2): 137-149.
- [3] CHANG L S, LIOU J C, LIN S R, et al. Purification and characterization of a neurotoxin from the venom of *Ophiophagus hannah* (king cobra) [J]. Biochem Biophys Res Comm, 2002, 294(3): 574-578.
- [4] SUE S C, JARRELL H C, BRISSON J R, et al. Dynamic characterization of the water binding loop in the P-type cardiotoxin: implication for the role of the bound water molecule [J]. Biochemistry, 2001, 40(43): 12782-12794.
- [5] EFREMOV R G, VOLYNKY P E, NOLDE D E, et al. Interaction of cardiotoxins with membranes: a molecular modeling study [J]. Biophys J, 2002, 83(1): 144-153.
- [6] WEI J F, LU Q M, JIN Y, et al. α -Neurotoxins of *Naja atra* and *Naja kaouthia* snakes in different regions [J]. Acta Biochim Biophys Sin(生物化学与生物物理学报), 2003, 35(8): 683-688.
- [7] TONG F D, ZHANG H H, JIN S H. Purification method for the neurotoxin and cardiotoxin from the venom of the cobra. China, 1740192A [P]. 2006-03-01.
- [8] MANG K Q, XU N Z, FANG R X, et al. Polyacrylamide Gel Electrophoresis(聚丙烯酰胺凝胶电泳)[M]. Beijing: Science Press, 1975: 26; 81; 88.
- [9] XU S Y, BIAN R L, CHEN X. The Methodology of Pharmacology-experiment(药理学实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982: 344; 506; 1151.
- [10] KOH D C I, ARMUGAM A, JEYASEELAN K. Snake venom components and their applications in biomedicine [J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63(24): 3030-3041.
- [11] MENG Q X, WANG W Y, LU Q M, et al. A novel short neurotoxin, cobrotoxin C, from monocellate cobra (*Naja kaouthia*) venom: isolation and purification, primary and secondary structure determination, and tertiary structure modeling [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2002, 132(1): 113-121.
- [12] LI F Z, CHENG Q Y, ZHU W J. Study on analgesic effect of cobroneurotoxin from Zhejiang Cobra Venom isolated and purified [J]. China Pharm(中国药师), 2004, 7(9): 659-661.

收稿日期: 2010-08-02