

尖吻蝮蛇凝血酶分离纯化新工艺研究*

邓沁, 吴忠, 彭维, 王永刚, 苏薇薇

(中山大学生命科学学院//广东省中药上市后质量与
药效再评价工程技术研究中心, 广东 广州 510275)

摘要: 尖吻蝮蛇凝血酶是从尖吻蝮蛇蛇毒中分离纯化得到的一种类凝血酶, 属于止血一类新药。建立了尖吻蝮蛇凝血酶分离纯化新工艺, 采用切向流过滤技术, 用两步离子交换层析分离得到高纯度的尖吻蝮蛇凝血酶, 再采用两步凝胶排阻层析去除热原和脱盐。该工艺具有简便高效的特点, 适合大规模工业化生产。

关键词: 尖吻蝮蛇凝血酶; 分离; 纯化; 工艺

中图分类号: R973⁺.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579(2016)06-0161-04

New process for separation and purification of Haemocoagulase Acutus

DENG Qin, WU Zhong, PENG Wei, WANG Yonggang, SU Weiwei

(Guangdong Engineering & Technology Research Center for Quality and Efficacy Re-Evaluation of Post-Market TCM // School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Haemocoagulase Acutus (Halase), a new hemostatic in development, is a high-performance thrombin-like enzyme (TLE) derived from snake venom of *Agkistrodon acutus*. Here we reported a new process established for separation and purification of Halase from snake venom. Combined with tangential flow filtration, ion exchange chromatography was conducted twice to effectively separate Halase, and two gel exclusion columns were used to remove pyrogen and salt. This new method is simple and efficient, and generates a high purity of Halase, making it a promising process in industrial scale application.

Key words: Haemocoagulase Acutus; separation; purification; process

尖吻蝮蛇凝血酶 (Haemocoagulase Acutus, 简称为 Halase) 是从尖吻蝮蛇蛇毒中分离纯化的一种类凝血酶, 它通过水解纤维蛋白的 A α 链, 使纤维蛋白原降解为纤维蛋白单体, 从而发挥凝血作用。研究表明尖吻蝮蛇凝血酶具有较强的止血作用, 且无毒^[1-4]。本团队建立了一种尖吻蝮蛇凝血酶分离纯化新工艺, 采用切向流过滤技术, 用两步离子交换层析分离得到高纯度的尖吻蝮蛇凝血酶, 再采用两步凝胶排阻层析去除热原和脱盐; 具有简便高效的特点, 适合大规模工业化生产, 现报道如下。

1 材料

1.1 实验仪器

蛋白分离纯化仪: GE Healthcare Life Sciences

公司 (GE Healthcare), 型号: AKTA prime plus; 层析柱: GE Healthcare, 型号: XK 50/30、XK 50/60; 膜过滤分离系统: GE Healthcare, 型号: QuixStandand Benchtop System; 微滤柱: GE Healthcare, 型号: CFP-4-E-4MA (420 cm², 0.45 μ m); 超滤柱: GE Healthcare, 型号: UFP-10-E-4MA (420 cm², 10 NMWC); 层析柜: 上海青浦沪西仪器厂, CXG-1; 便携式 pH 计: OHAUS 公司, 型号: STARER 3000; 高效液相色谱仪: Dionex 公司, 型号: UltiMate 3000; 色谱柱: 广州菲罗门科学仪器有限公司, 型号: BioSep-SEC-S 2000 (7.8 mm \times 300 mm, 5 μ m); 飞行时间质谱: Bruker Daltonics 公司, 型号: Ultraflex TOF/TOF III; 电泳仪: Bio Rad 公司, 型号: Mini-proten

* 收稿日期: 2016-03-30

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2011ZX09101-002-02); 广东省重大科技专项 (2011A080501004)

作者简介: 邓沁 (1988年生), 女; 研究方向: 现代生物医药工程; 通讯作者: 苏薇薇; E-mail: lsssw@126.com

III; 凝胶扫描仪: BioRad 公司, 型号: GS - 800; 摇床: 海门其林贝尔公司, 型号: BETS - M1 脱色微型圆周摇床; 超净工作台: 上海锦屏仪表有限公司, 型号: SW - G6; 电子天平: 美国 G&G 公司, G&G ELECTRONIC SCALE (500 g, d = 0.1 g); 磁力搅拌器: 德国 IKA 公司, 型号: RCT basic; 超声仪: 昆山市超声仪器有限公司, 型号: KQ - 500DE; 水浴锅: 上海跃进医疗器械厂, 型号: HH · B11 · 420。

1.2 实验试剂

尖吻蝮蛇蛇毒: 江西五步蛇生物科技有限公司, 批号: 201306; 阴离子交换层析填料: DEAE Sepharose™ Fast Flow, 批号: 10143954; 分子筛凝胶层析填料: Superdex™ 75 prep grade, 批号: 10152155; 分子筛凝胶层析填料: Sephadex™ G - 25, 批号: 10034116; 磷酸氢二钠, 广州化学试剂厂, 批号: 20140407 - 1; 磷酸二氢钠, 天津市福晨化学试剂厂, 批号: 20140107; 氯化钠, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20140818; 氢氧化钠, 广州化学试剂厂, 批号: 20130805 - 1; 水为超纯水。磷酸氢二钾, 广东光华化学试剂厂, 批号: 20131120; 磷酸二氢钾, 广东光华化学试剂厂, 批号: 20131110; 甲醇 (色谱纯), Honeywell, 批号: 09ZG1H。Lowry 法蛋白定量试剂盒, 上海贝博生物科技有限公司, 批号: 201012。Pierce 非预染蛋白 Marker, Thermo Scientific, 批号: 00132053; $w = 12\%$ SDS - PAGE 预制胶, 文渊阁生物科技 (上海) 有限公司; $5 \times$ SDS - PAGE 上样缓冲液, GenStar, 批号: E153 - 0; $5 \times$ 电泳液, 碧云天生物技术研究所, 批号: P0014B; $w = 0.1\%$ 考马斯亮蓝 R250, Amresco, 批号: 0472; 乙醇, 广州化学试剂厂, 批号: 20140105 - 1; 冰醋酸 (分析纯), 广州化学试剂厂, 批号: 20121105 - 2。病毒灭活冰冻血浆, 肇庆市中心血站; 尿素, 广州化学试剂厂, 批号: 20020103 - 2。

2 方法

2.1 分离纯化

取尖吻蝮蛇蛇毒粉末 7.5 g, 至于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 层析柜中, 用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) 约 75 mL 搅拌溶解 2 h, 待蛇毒完全溶解后, 用上述磷酸盐缓冲液稀释至 200 mL; 用孔径为 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的微滤柱微滤, 收集滤液并加入上述磷酸盐缓冲液稀释至 300 mL; 再用孔径为 10 NMWC 的超滤柱超滤, 收集滤液 (I), 备用。

用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) 先平衡 DEAE Sepharose™ Fast Flow 层析柱, 取滤液 (I) 上层析柱 (10 mL/min); 待滤液全部倒入后, 即用上述磷酸盐缓冲液冲洗层析柱 (35 mL/min), 直至紫外检测器无峰信号检出 (280 nm); 然后用含 0.05 mol/L NaCl 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 6.8) 冲洗层析柱 (10 mL/min), 监测紫外吸收峰信号, 收集紫外吸收峰处滤液; 用 HPLC、SDS - PAGE 电泳和促人血浆凝固活性检测方法监测其是否为目标组分; 对目标组分用孔径为 10 NMWC 的超滤柱进行超滤浓缩, 收集滤液 (II), 备用。

用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 先平衡 DEAE Sepharose™ Fast Flow 层析柱, 取滤液 (II) 上层析柱 (10 mL/min); 待滤液全部倒入后, 即用磷酸盐缓冲液冲洗层析柱 (35 mL/min), 直至紫外检测器无峰信号检出 (280 nm); 然后分别用含 0.03 mol/L NaCl 和 0.1 mol/L NaCl 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 冲洗层析柱 (20 mL/min), 监测紫外吸收峰信号, 收集紫外吸收峰处滤液; 用 HPLC、SDS - PAGE 电泳和促人血浆凝固活性检测方法监测其是否为目标组分; 对目标组分用孔径为 10 NMWC 的超滤柱进行超滤浓缩, 收集滤液 (III), 备用。

用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 先平衡 Superdex™ 75 prep grade 层析柱, 取滤液 (III) 上层析柱 (20 mL/min); 待滤液全部倒入后, 用磷酸盐缓冲液冲洗层析柱 (20 mL/min), 监测紫外吸收峰信号 (280 nm), 收集紫外吸收峰处滤液 (IV), 备用; 用 HPLC、SDS - PAGE 电泳和促人血浆凝固活性检测方法监测其是否为目标组分。

用超纯水先平衡 Sephadex™ G25 层析柱, 取滤液 (IV) 上层析柱 (20 mL/min); 待滤液全部倒入后, 即用注射用水洗脱目标物冲洗层析柱 (20 mL/min), 监测紫外吸收峰信号 (280 nm), 收集紫外吸收峰处滤液 (V); 用 HPLC、SDS - PAGE 电泳和促人血浆凝固活性检测方法监测其是否为目标组分。

2.2 HPLC 纯度检测

取分离纯化所得的尖吻蝮蛇凝血酶溶液, 按照高效液相色谱法 (《中国药典》2015 年版 (四部) 通则 0512) 测定^[5]。色谱条件与系统适应性: Bio-Sep - SEC - S 2000 色谱柱; 以 pH 6.8 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液为流动相, 检测波长为 280 nm , 流速为 1 mL/min , 理论塔板数不得少于 2 000; 按面

积归一化法计算尖吻蝮蛇凝血酶相对百分含量。

2.3 SDS - PAGE 电泳检测

取分离纯化所得的尖吻蝮蛇凝血酶溶液，参考 Amersham Pharmacia 公司的蛋白电泳技术手册^[6]，采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法（SDS - PAGE）对尖吻蝮蛇凝血酶进行电泳分析。

2.4 精确相对分子质量测定

取分离纯化所得的尖吻蝮蛇凝血酶溶液，采用基质辅助激光解析串联飞行时间质谱法（MALDI - TOF - MS）测定精确相对分子质量^[7]。

2.5 酶比活性测定

人血浆凝固时间法：量取人血浆 0.2 mL 至于试管中，在 37 °C 水浴中保温约 2 min；加入分离纯化所得的尖吻蝮蛇凝血酶溶液 0.2 mL 后，立即摇匀计时，人血浆溶液应在 (60 ± 20) s 内振摇后出现凝结；再加入 1 mL 5 mol/L 尿素溶液后振摇，凝块溶解，溶液变清。采用 Lowry 法^[8]测定分离纯化所得的尖吻蝮蛇凝血酶的蛋白质含量，计算在 37 °C 条件下，使标准人血浆在 (60 ± 20) s 内振摇后出现絮状物的尖吻蝮蛇凝血酶量。

3 结果与讨论

3.1 分离纯化

本研究建立了一种尖吻蝮蛇凝血酶分离纯化新工艺，分离纯化过程见图 1。

结果显示，经过微滤和超滤后，尖吻蝮蛇蛇毒中的大量杂质即被除去；初步除杂后的蛇毒溶液随后通过两次 DEAE Sepharose™ Fast Flow 阴离子交换层析，可分离得到纯度较高的尖吻蝮蛇凝血酶；再通过 Superdex™ 75 prep grade 和 Sephadex™ G - 25 两步凝胶排阻层析，制备出高纯度的尖吻蝮蛇凝血酶。

3.2 纯度测定

分离纯化所得的尖吻蝮蛇凝血酶的高效液相色谱呈单一对称峰，记录色谱图见图 2，按面积归一化法计算其纯度达 99.69%，如表 1 所示。

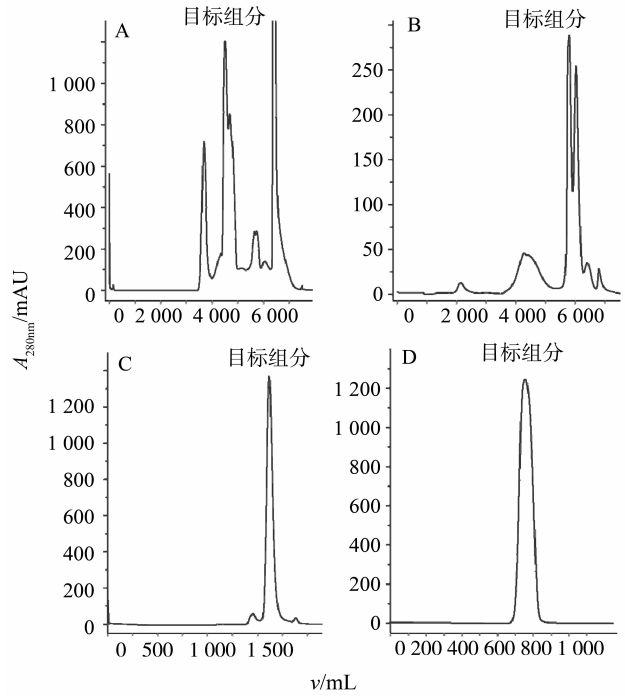


图 1 尖吻蝮蛇凝血酶纯化过程中收集的组分紫外峰信号
Fig.1 UV Signals during Separation and Purification of Halse
A: 过 DEAE Sepharose™ Fast Flow 柱 (pH 6.8); B: 过 DEAE Sepharose™ Fast Flow 柱 (pH 7.5); C: 过 Superdex™ 75 prep grade 柱; D: 过 Sephadex™ G - 25 柱

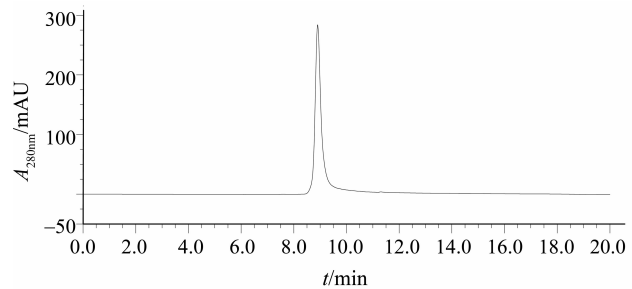


图 2 尖吻蝮蛇凝血酶的 HPLC 图谱
Fig.2 HPLC chromatogram of Halse

3.3 SDS - PAGE 电泳检测

纯化所得的尖吻蝮蛇凝血酶经 SDS - PAGE 电泳检测，结果如图 3，呈现两条清晰条带。

表 1 尖吻蝮蛇凝血酶的 HPLC 谱图相对峰面积
Table 1 Relative peak area of Halse HPLC chromatogram

序号	保留时间/ min	峰面积/ (mAU · min)	相对 峰面积/%	峰宽/ min	峰高/ mAU	分离度	不对称度	塔板数
1	8.907	85.732	99.69	0.38	283.307	6.82	1.52	8 877
2	11.300	0.265	0.31	0.31	0.980	n. a.	4.04	19 256

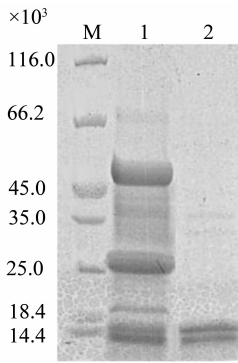


图 3 尖吻蝮蛇凝血酶 SDS - PAGE 电泳图

Fig. 3 SDS - PAGE analysis of Halase

M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: 用于第一次 DEAE Sepharose™ Fast Flow 柱层析的滤液 (I); 2: 分离纯化所得的最终滤液 (V)

3.4 精确相对分子质量测定

MALDI - TOF - MS 相对分子质量测定结果如图 4 所示, $m/z = 29\ 245.020$ 质谱峰为尖吻蝮蛇凝血酶的质子化分子离子峰 $[M + H]^+$; $m/z = 58\ 506.131$ 是尖吻蝮蛇凝血酶的二聚体离子峰 $[2M + H]^+$ 。尖吻蝮蛇凝血酶的精确相对分子质量为 29 245.020。

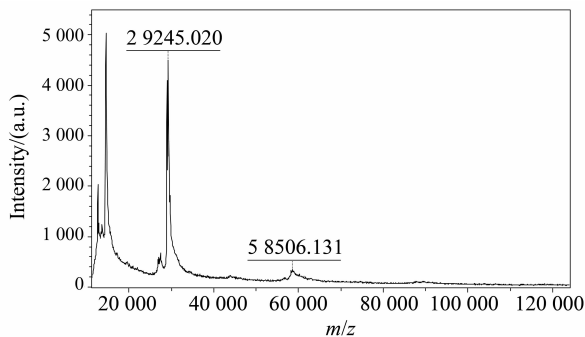


图 4 尖吻蝮蛇凝血酶 MALDI - TOF - MS 图谱

Fig. 4 MALDI - TOF - MS analysis of Halase

3.5 比活性测定

最终分离纯化所得的尖吻蝮蛇凝血酶的比活为 185.19 U/mg。

3.6 讨论

本文探讨的一种尖吻蝮蛇凝血酶分离纯化新工艺, 以微滤与超滤代替传统的离心与透析实现蛇毒粗蛋白的快速除杂, 随后两步阴离子交换层析的洗脱步骤简单, 可稳定重复, 最后通过两步凝胶过滤分子筛层析先除热源后脱盐, 有效分离出具有较强凝血活性的尖吻蝮蛇凝血酶。分离纯化过程以 HPLC、SDS - PAGE 电泳和促人血浆凝固活性检测作为制备工艺的监测手段。该工艺操作简单高效, 适合大规模工业化生产。

参考文献:

- [1] 吴忠. 尖吻蝮蛇凝血酶用作出血性疾病的药物: 中国, CN1218747[P]. 2003 - 08 - 14.
- [2] 吴忠. 止血一类新药 Halase 的药效学研究[J]. 中药材, 2005, 28(2): 125 - 128.
- [3] 苏薇薇. 止血一类新药 Halase 的长期毒性试验[J]. 中药材, 2005, 28(3): 211 - 212.
- [4] 吴忠. 止血一类新药 Halase 的一般药理学研究[J]. 中药材, 2005, 28(4): 326 - 327.
- [5] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 59 - 61.
- [6] Amersham Pharmacia Biotech. Protein electrophoresis technical manual[M]. New York: Amersham Pharmacia Biotech, 1999: 13 - 19.
- [7] 张珍英, 邓慧敏, 邓芹英. 香豆素类新基质在基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱测定多糖和糖蛋白中的应用[J]. 分析化学, 2008, 36(10): 1419 - 1422.
- [8] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 32 - 34.