

高效离子交换色谱法分离皖南尖吻蝮蛇毒活性组分*

钱亚雯 寿晓海* 承新* 王淳

(中国科学技术大学生物系 合肥 230027)

提 要 采用高效离子交换色谱法对经初步分离的皖南尖吻蝮蛇毒活性成分进行进一步的分离纯化,采用线性梯度洗脱,得到蝮蛇毒活性组分纯品,并用峰面积归一化法计算其含量为45.41%左右,纯度在90%以上。

关键词 高效离子交换色谱法,皖南尖吻蝮蛇毒,活性组分

分类号 O658/R93

1 前言

蝮蛇毒液中含有丰富的蛋白质和酶^[1]。它的活性组分中既有出血毒素^[2]、类凝血酶样酶和抗凝组分^[3],也有能作用于纤维蛋白原和纤维蛋白的纤溶组分。这些活性组分具有降解纤维蛋白原和纤维蛋白、降低血液粘度的作用,有着重要的医学价值^[4]。但蛇毒的组分非常复杂,因此对单一活性成分的分离纯化比较困难。我们用高效离子交换色谱法对经初步分离的皖南尖吻蝮蛇毒进行了色谱条件的筛选和优化分离,得到一活性组分。经鉴定,纯度在90%以上,并能降解人纤维蛋白原和纤维蛋白,具有很好的应用前景。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Waters-650 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), Protein-PAK™ DEAE-8HR 离子交换色谱柱(100.0mm×10.0mm i.d.,美国 Waters 公司), DYA 电泳仪(上海康达电子仪器厂),岛津 CS-930 薄层色谱扫描仪(日本岛津公司)。

皖南尖吻蝮蛇毒干粉(购于皖南山区),丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺(美国 Sigma 公司),实验室其它试剂均为国产分析纯。

2.2 实验方法

2.2.1 样品预处理

蛇毒经离子交换色谱和凝胶排阻色谱初步分离后,再对其中具有纤溶活性的组分脱盐处理,得到蛋白浓度约4g/L 的样品。经电泳鉴定有三条主带。

2.2.2 色谱条件的选择

由于待分离样品为酸性蛋白,因而固定相选用离子交换色谱柱 DEAE-8HR (5μm),流动相选用 Tris-HCl 缓冲系统,其中,流动相 A: 0.02mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0),流动相 B: 0.02mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)-0.5mol/L NaCl。梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

t/m in	A (%)	B (%)
0.0	100	0
5.0	100	0
5.01	90	10
60.00	0	100
70.00	0	100

分离图谱见图1,其中第3个峰即为我们所需的活性组分,与电泳鉴定结果相符,分离效果很好。

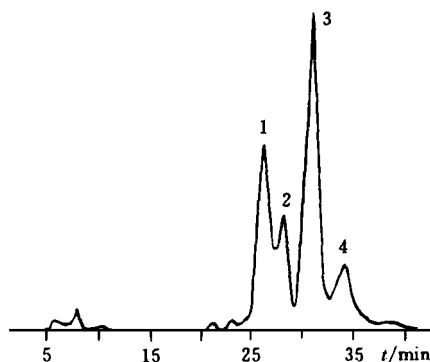


图1 色谱分离图谱

Fig. 1 Chromatogram of the purified snake venom

* 通讯联系人

** 中国科技大学应用化学系九〇届本科生

本文收稿日期:1996-12-22,修回日期:1997-09-08

2.2.3 样品的测定与少量纯样的制备

取上述预处理的样品,按“2.2.2项”下的色谱条件分离纯化,用峰面积归一化法计算含量,结果见表2。表2的数据表明方法重现性好,活性组分的含量约为45.41%。

表2 高效液相离子交换色谱法分离活性组分

Table 2 The isolation of the active component from snake venom by high performance ion-exchange liquid chromatography

序号 No.	活性组分峰面积 Area of active component ($\times 10^{-7}$)	总峰面积 Total area ($\times 10^{-8}$)	含量 Content (%)	$\bar{X} \pm \sigma$ (%)
1	9.638	2.080	46.34	
2	8.002	1.804	44.36	
3	9.485	2.076	45.69	45.41 \pm
4	8.825	1.975	44.68	0.85
5	9.945	2.163	45.98	

采用加大进样量和提高样品溶液浓度的方法,可以在该高效离子交换色谱柱上制得毫克级纯样。所得到的活性组分纯品经初步鉴定,可作用于纤维蛋白原和纤维蛋白,具有很好的降解纤维蛋白原和纤维蛋白的作用。

2.2.4 活性组分纯度鉴定

经聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)鉴定,该活性组分的纯度在90%以上(见图2)。

3 讨论

(1)分离纯化生物活性物质,必须注意保护其生物活性,这里流动相的选择是关键,其中包括

pH 值、缓冲液浓度等因素的选择。当 pH 值接近等电点时,容易引起生物活性物质的沉淀而不利于分离。由于待测物在 pH 8.0左右生物活性最高,故选择 Tris-HCl 缓冲体系的 pH 值为8.0。而缓冲液浓度过高时,对分离条件不利,样品未经交换即下柱,故选择 Tris-HCl 缓冲液浓度为0.02mol/L。

(2)用高效离子交换色谱法分离分析样品时,必须注意色谱柱的清洗和再生,待色谱柱在起始流动相中达到平衡后才上样,否则样品不易与色谱柱结合而被冲洗下来。

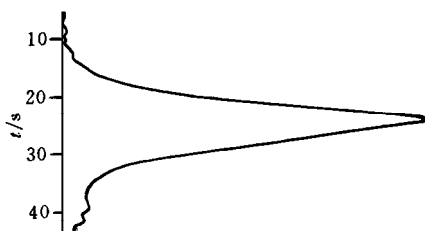


图2 聚丙烯酰胺凝胶电泳扫描图谱

Fig. 2 Chromatogram of the results of PAGE

参 考 文 献

- 1 叶智彰. 动物学研究, 1981, 2: 33~ 36
- 2 黄婉治, 王 淳. 中国科技大学学报, 1981, 16(3): 102~ 105
- 3 王 淳, 黄婉治. 动物学研究, 1981, 2(4): 89~ 91
- 4 王 淳. 蛇毒纤溶组分的纯化和性质鉴定. 中国黄山国际两栖类爬行动物学学术会议论文集. 黄山, 1993. 182 ~ 185

Isolation and Purification of the Active Principle from Agkistrodon Acutus Snake Venom by High Performance Ion-Exchange Liquid Chromatography

Q ian Yawen, Shou Xiaohai, Cheng Xin and Wang Chun

(Department of Biology, University of Science and Technology of China, Hefei, 230027)

Abstract The active component from Agkistrodon acutus snake venom was further purified by high performance ion-exchange liquid chromatography over a Protein-PAK™ DEAE-8HR column (10.0mm i. d. \times 100mm). The elution was operated with a linear gradient from 10% to 100% NaCl-0.02mol/L Tris-HCl buffer(pH 8.0). The quantitative results were calculated as 45.41% based on peak area normalization and the purity of the active component was 90% determined by electrophoresis.

Key words high performance ion-exchange liquid chromatography, Agkistrodon acutus snake venom, active component