

基于蛋白免疫印迹的水蛭抗凝活性成分研究*

程 珊^{1,2}, 汪 波¹, 肖 凌¹, 聂 晶^{1**}, 郑 健^{3**}

(1. 湖北省药品监督检验研究院 武汉 430064; 2. 湖北中医药大学药学院 武汉 430065;
3. 中国食品药品检定研究院 北京 100010)

摘 要:目的:建立Native-PAGE结合Western blot检测水蛭活性多肽与凝血酶相互作用产物的方法,探究水蛭有效抗凝成分。方法:本研究分别提取宽体金线蛭、日本医蛭两种水蛭虫体总蛋白及日本医蛭唾液蛋白,用凝血酶滴定法测定其抗凝血酶活性,Western blot检测凝血酶-活性多肽复合物。结果:研究发现两种水蛭Native-PAGE-WB均检测到凝血酶-活性多肽复合物,且SDS-PAGE-WB检测到复合物变性后产生凝血酶条带。结论:建立的Native-PAGE-WB法可有效检出水蛭活性多肽和凝血酶相互作用产物,且发现同水蛭素类似,宽体金线蛭活性抗凝多肽与凝血酶在体外也能形成稳定的蛋白复合物。

关键词:宽体金线蛭 日本医蛭 凝血酶 Native-PAGE 抗凝成分 Western Blot

doi: 10.11842/wst.2019.04.015 中图分类号: R284.1 文献标识码: A

水蛭,又称蚂蟥,具有破血、逐瘀、通经功效的功效,始载于《神农本草经》^[1]。中国药典规定,水蛭药材来源为水蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman (即宽体金线蛭)、水蛭 *Whitmania pigra* Whitman、*Hirudo nipponica* Whitman (即日本医蛭)或柳叶蚂蟥 *Whitmania acranulate* Whitman (即尖细金线蛭)的干燥全体^[2]。近百年来人们在其分泌物中发现多种抗凝活性物质,如欧洲医蛭中分离出的最强凝血酶抑制剂水蛭素^[3,4]、凝血因子Xa抑制剂 vizottin^[5]和凝血因子XIIIa抑制剂 Tridegin^[6]等。然而当前仍只有水蛭素进入临床,其他有效成分还在研究之中。日本医蛭为吸血性水蛭,唾液中含有水蛭素;宽体金线蛭为国内市场最常见的非吸血类水蛭,万明研究发现加热提取宽体金线蛭并不影响抗凝血物质的活性^[7],而水蛭素在加热条件下易被破坏^[8],说明宽体金线蛭内含有与水蛭素不同的抗

凝物质,其有效抗凝成分仍待进一步研究。本研究总结前人研究成果,提出利用NP-40裂解液提取水蛭总蛋白,凝血酶滴定法测定抗凝血酶活性,将总蛋白与凝血酶混合后,采用Native-PAGE-Western Blot (简称Native-PAGE-WB)的方法检测凝血酶与活性抗凝成分的相互作用。

1 仪器与试剂

Thermo Scientific Sorvall Legend MicroPICO 17/21 微量离心机; BioRad Fireware Version 1.07 PowerpacTMHC 电源, Mini-PROTEAN Tetra 小型垂直电泳槽; Hoefer TE77XP 转膜仪; Amersham™ Imager 凝胶成像仪。

NP-40、预染蛋白Marker、BCA蛋白定量检测试剂盒购自生工生物公司; Amicon Ultra-0.5 3kD 超滤管购自 Millipore 公司; 凝血酶标准品购自 sigma 公司; 纤维

收稿日期: 2018-03-18

修回日期: 2018-04-20

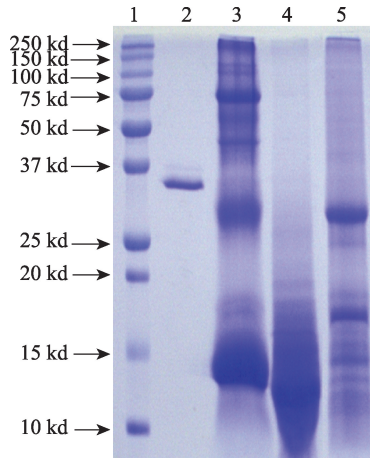
* 湖北省科技厅自然科学基金项目(2016CFB404):水蛭体外抗凝血机制及活性评价的研究,负责人:肖凌;湖北省食品药品监督管理局科研项目(2016010+29):以水蛭为示范的动物药材DNA分子鉴定系统构建,负责人:汪波;中医药行业科研专项(201507002):中药饮片质量保障系统研究(一),负责人:郑健。

** 通讯作者:聂晶,主任药师,从事药品质量分析研究;郑健,研究员,从事中药名族药质量控制研究。

表1 水蛭提取物蛋白含量及抗凝血酶活性 (n=3)

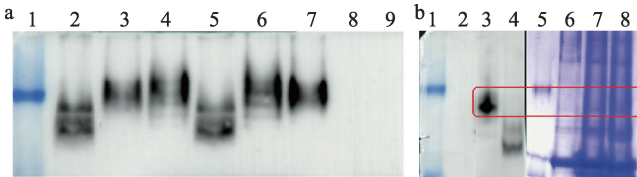
样品	蛋白质含量	消耗凝血酶体积*	抗凝血酶活性
日本医蛭	8.32 mg·mL ⁻¹	30 μL	1.44 U·mg ⁻¹
医蛭唾液	9.63 mg·mL ⁻¹	35 μL	1.45 U·mg ⁻¹
宽体金线蛭	9.38 mg·mL ⁻¹	25 μL	1.06 U·mg ⁻¹

*凝血酶溶液均为 40 U·mL⁻¹。



1:Marker 2:凝血酶 3:日本医蛭 4:日本医蛭唾液 5:宽体金线蛭

图1 水蛭总蛋白 15% SDS-PAGE 电泳 (n=3)



(a)1:Marker 10 μL 2、5: 凝血酶 10 μL 3: 凝血酶 10 μL+日本医蛭唾液蛋白 10 μL 4: 凝血酶 10 μL+日本医蛭唾液蛋白 15 μL 6: 凝血酶 10 μL+日本医蛭唾液蛋白 20 μL 7: 凝血酶 10 μL+日本医蛭唾液蛋白 25 μL 8、9: 日本医蛭唾液蛋白 10 μL (b)1、5: Marker 2、6: 日本医蛭唾液蛋白 3、7、8: 日本医蛭唾液蛋白+凝血酶 4:凝血酶

图2 日本医蛭唾液蛋白+凝血酶 Native-PAGE 电泳考染及 western blot 结果(n=3)

蛋白原(牛血)购自中国食品药品检定研究院;凝血酶兔单克隆抗体购自 abcam 公司;羊抗兔 IgG-HRP 购自武汉塞维尔公司;BeyoECL Star(特超敏 ECL 化学发光试剂盒)购自碧云天生物技术有限公司。

宽体金线蛭采集自山东省济宁市徽山湖),日本医蛭采集自湖北省荆州市公安县青吉工业园)。

2 方法与结果

2.1 日本医蛭、宽体金线蛭样品制备

2.1.1 日本医蛭唾液蛋白

活体日本医蛭喂食 NaCl 诱导分泌唾液,收集唾液后

离心取上清,3 kDa 超滤管脱盐后冷冻干燥成粉末保存。

2.1.2 日本医蛭、宽体金线蛭虫体总蛋白

取适量日本医蛭、宽体金线蛭干品,研磨成细粉,用约 10 倍体积 60-90℃石油醚冰水浴超声脱脂,倾出石油醚,挥干剩余残渣。取冰预冷的 NP-40 裂解液(20 mmol·L⁻¹Tris-HCl,137 mmol·L⁻¹ NaCl,10%甘油,1% NP-40),按 20 mg:250 μL 的比例加入向残渣中裂解液;冰水浴超声至充分裂解后 4℃,13 000 r·min⁻¹ 离心 15 min;吸取离心后的上清液于 3 kDa 超滤管中,4℃,4 000 r·min⁻¹ 离心 1 h,弃去管芯内沉淀后即总蛋白样品,置-40℃保存。用 BCA 法测定蛋白浓度;用药典 2015 版一部水蛭含量测定方法测定抗凝血酶活性,测定结果见表 1。

2.2 水蛭总蛋白组分 SDS-PAGE 电泳

配制 5% 浓缩胶和 15% SDS-PAGE 分离胶,取 2.1 项下总蛋白样品及日本医蛭唾液蛋白作变性处理后离心取上清加样。先以 100 V 恒压电泳至分离胶,再调为 250 V 恒压 20 min;考马斯亮蓝染色液染色 4 h;倾去染色液,加入脱色液脱色,直至获得蓝色条带及干净的背景,拍照保存,结果见图 1。

2.3 水蛭总蛋白+凝血酶 Native-PAGE-WB 实验

配制 5% 浓缩胶和 6% Native-PAGE 分离胶,加样蛋白 Marker,凝血酶,日本医蛭唾液蛋白,凝血酶与日本医蛭唾液蛋白各混合后上样;以上每份样品于同一块 6% Native-PAGE 胶平行上样两个泳道,一份行 WB 检测,另一份考马斯亮蓝染色。先以 100V 恒压电泳至分离胶,再调为 250V 恒压 20min 到电泳结束,冰水浴使电泳槽温度维持低温。电泳结束后,将行 WB 检测的聚丙烯酰胺凝胶沿垂直方向切下置于转膜仪中,75 mA 转膜 25 min;5%脱脂奶粉封闭 2 h,1:1 000 凝血酶一抗室温孵育 2 h,1:3 000 羊抗兔 IgG-HRP 孵育 1 h,洗膜后按 BeyoECL Star 试剂盒所提供的方法孵育 PVDF 膜 1-3 min 后,AI600 凝胶成像系统拍照,western blot 结果见图 2a 及图 2b 泳道 1、2、3、4。宽体金线蛭总蛋白同法操作,western blot 结果见图 3a 及图 3b 泳道 1、2、3、4。

电泳结束后将 6% Native-PAGE 胶的另一半剥下,置于考马斯亮蓝染色液染色 4h;倾去染色液,更换脱色液脱色,直至获得蓝色条带及干净的背景,拍照保存,考染结果见图 2b 泳道 5、6、7、8。宽体金线蛭总蛋白同法操作,考染结果见图 3b 泳道 5、6、7、8、9。

2.4 蛋白质复合体条带切胶回收

胶内蛋白质回收的方法改进自王晓东的研究成

果^[9-10]。沿边缘切取2.3项下经考马斯亮蓝染色的蛋白质复合体胶带(图2b泳道7、8;图3b泳道5、6框内标注处),用研磨棒研碎,加入脱色液(50% ACN/25mM NH_4CO_3)震荡脱色至无色;离心后吸除上清,用ACN使凝胶完全脱水后挥干;随后加入适量0.25% $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶液使凝胶完全浸没,充分混匀后置于冰水浴超声萃取胶内蛋白质25 min;离心取上清至新的离心管中,剩余的胶粒用少量去离子水清洗3次后,洗涤液合并萃取液;随后将萃取溶液真空冷冻干燥至固体。

2.5 蛋白质复合体SDS-PAGE-WB实验

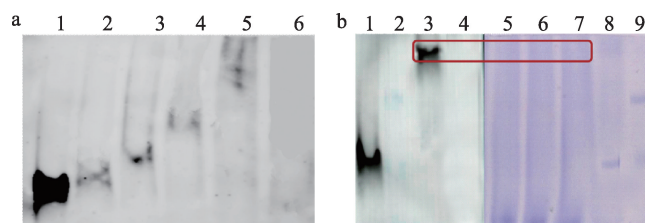
配制5%浓缩胶和12%SDS-PAGE分离胶,将2.4项下回收蛋白质复合体用Milli-Q水溶解,另取适量凝血酶标准品,分别加5×SDS-PAGE作变性处理后离心取上清上样25 μL 。先以100V恒压10 min电泳至分离胶,250 V恒压到电泳结束;后续操作同2.3,western blot结果见图4。

3 讨论

3.1 日本医蛭、宽体金线蛭总蛋白及其活性分析

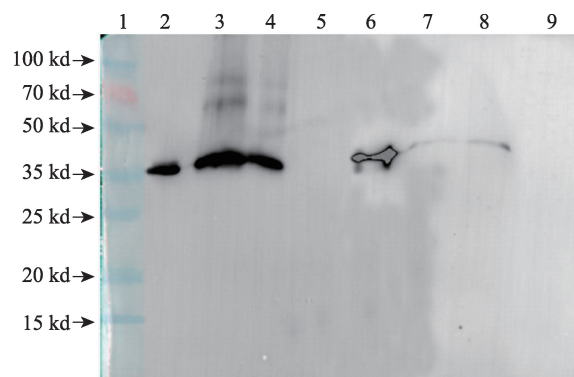
水蛭素(hirudin)是迄今发现最强的凝血酶特异性抑制剂^[4],是水蛭中具有代表性的药理活性物质,是否含有水蛭素以及其含量的多寡可以作为药用水蛭功效的一个重要检验标准^[11]。市场常见的水蛭药材中,吸血型水蛭日本医蛭中可提取出水蛭素^[12],而非吸血型水蛭宽体金线蛭不含水蛭素,且其干品与鲜品中纤溶活性基本相同,说明此纤溶物质并不是来源于唾液腺,是不同于水蛭素的活性物质^[13],故本研究并未考察宽体金线蛭唾液。

应用较为温和的NP-40裂解液提取总蛋白,在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳条件下实现凝血酶-活性多肽复合体与其他成分的分离,极大简化了有效成分分离纯化的过程,最大程度地保留活性蛋白,相比RIPA裂解液^[14]避免了变性剂对蛋白质活性的破坏,相比丙酮浸提法,醇浸提法^[15]减少有机试剂的疏水结合导致的蛋白变性。表1水蛭提取物蛋白含量及抗凝血酶活性测定结果表明:NP-40裂解液提取宽体金线蛭、日本医蛭总蛋白能有效保留其抗凝活性,其中宽体金线蛭提取物抗凝活性(1.06 U/mg)高于李宝红^[16]经过DEAE Sephadex A-50、Sephadex G-50凝胶柱分离纯化所得抗凝组份活性(225.28±1.03 U/g)。图1总蛋白SDS-PAGE电泳图表明日本医蛭唾液蛋白分子量集中在20 kDa以下肽段;日本医蛭、宽体金线蛭虫体提取物蛋



(a)1: 凝血酶 10 μL 2: 凝血酶 10 μL +宽体金线蛭总蛋白 5 μL 3: 凝血酶 10 μL +宽体金线蛭总蛋白 10 μL 4: 凝血酶 10 μL +宽体金线蛭总蛋白 15 μL 5: 凝血酶 10 μL +宽体金线蛭总蛋白 20 μL 6: 宽体金线蛭总蛋白 20 μL (b)1、8: 凝血酶 2、9: Marker 3、5、6: 凝血酶+宽体金线蛭总蛋白 4、7: 宽体金线蛭总蛋白

图3 宽体金线蛭总蛋白+凝血酶Native-PAGE电泳考染及western blot结果(n=3)



1: Marker 2、6: 凝血酶 3、4: 日本医蛭唾液回收复合体 5: 日本医蛭唾液 7、8 宽体金线蛭回收复合体 9: 宽体金线蛭总蛋白

图4 蛋白质复合体SDS-PAGE-WB (n=3)

白分子量从10-250 kDa均有分布,此结果与汪波等^[12]RIPA裂解液提取水蛭总蛋白研究成果相似。

3.2 western blot 结果分析

宽体金线蛭是目前国内药材市场最常见的水蛭药材,其抗凝成分一直是国内研究者的热点,如任尧采用Alcalase酶解宽体金线蛭分离蛋白,通过离子交换色谱、凝胶过滤色谱、RP-HPLC纯化后,得到具有抗凝活性的产物 WA_{3-1} ^[17]。Zheng等发现宽体金线蛭中分离出的活性寡肽具有耐热特性^[18]。利用水蛭素和凝血酶相互作用特性^[19],将日本医蛭唾液与凝血酶混合后进行Native-PAGE-WB实验,可见水蛭素-凝血酶复合物条带(图2a泳道3、4、6、7,图2b泳道3)。由此建立的Native-PAGE-WB的方法应用于宽体金线蛭总蛋白与凝血酶混合物体系中,检测到的蛋白复合体条带位置明显区别于凝血酶单体(图3a、图3b),且宽体金线蛭总蛋白与凝血酶混合比例不同,复合物条带位置略有

不同(图3a泳道2、3、4、5)。为便于回收实验选点切胶,选取宽体金线蛭总蛋白与凝血酶体积比2:1(图3b泳道5、6)进行后续实验;实验结果表明宽体金线蛭中抗凝血酶活性多肽与凝血酶可能形成不同比例结合复

合体。复合体在加热变性过程中失去相互作用力,蛋白电泳分离后出现同凝血酶单体相同条带(如图4泳道6、7、8),结果表明了宽体金线蛭中含有与凝血酶结合的活性多肽,且能与凝血酶稳定结合形成复合体。

参考文献

- 1 张和韩,王丽萍.水蛭素的研究进展.中国中西医结合肾病杂志,2013(1):76-78.
- 2 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部).北京:化学工业出版社,2015:83
- 3 Markwardt F. Isolation and chemical characterization of hirudin. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, 1957, 308(2-4): 147.
- 4 Markwardt F. Hirudin as alternative anticoagulant—a historical review. Seminars in Thrombosis & Hemostasis, 2002, 28(5): 405.
- 5 Oliveira D G L, Alvarez-Flores M P, Lopes A R, et al. Functional characterisation of vizottin, the first factor Xa inhibitor purified from the leech *Haementeria vizottoi*. *Thromb Haemost*, 2012, 108(3): 570-578.
- 6 Finney S, Seale L, Sawyer R T, et al. Tridegin, a new peptidic inhibitor of factor XIIIa, from the blood-sucking leech *Haementeria ghilianii*. *Biochem J.* (1997) 324, 797-805
- 7 万明.宽体金线蛭抗凝血活性寡肽研究.长沙:湖北中医药大学博士学位论文,2012.
- 8 欧兴长,丁家欣,张玲.水蛭素的研究概况.中国药理学杂志,1991,26(7):396-399.
- 10 Wang X, Li F, Song G, et al. Broad-spectrum four-dimensional orthogonal electrophoresis: a novel comprehensively feasible system for protein complexomics investigation. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(9): 786-799.
- 11 张卫,张瑞贤,李健,等.中药水蛭品种考证及资源可持续利用发展探讨.中国中药杂志,2013,38(6):914-918.
- 12 石萍,鲁增辉,曾伟,等.日本医蛭的研究进展.世界科学技术-中医药现代化,2016,18(11):2013-2018.
- 13 孙倩倩.水蛭纤溶活性蛋白的分离纯化与性质研究.山东大学,2014.
- 15 张彬,汪波,龚元,于翔,吕军仪.几种水蛭抗凝血物质提取及活性分析.中山大学学报(自然科学版),2012,51(4):92-96.
- 16 李宝红.基于水蛭传统给药的抗凝活性组份的相关研究.广州:广州中医药大学博士学位论文,2014.
- 18 Zheng X, Li J, Chen Z, et al. Purification and characterization of an anticoagulant oligopeptide from *Whitmania pigra* Whitman. *Pharmacogn Mag*, 2015, 11(43): 444-448.
- 19 Tan C, Wan W, Zhang R, et al. The study of the relationship of r-hirudin and prethrombus. *Nuclear Techniques*, 2000, 23(5): 343-346.

Study on Active Anticoagulants of Two Leech Species by Native-PAGE-WB Methods

Cheng Shan^{1,2}, Wang Bo¹, Xiao Ling¹, Nie Jing¹, Zheng Jian³

(1. Hubei Institution for Drug Control, Wuhan 630064, China;

2. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100010, China)

Abstract: Native-PAGE can conserve the bioactivity of protein after the separation of electrophoresis. Western blot is a protein detection technique used to detect specific antigens (such as thrombin) with specific antibodies. In this research Native-PAGE-WB methods was established to detect Protein-Protein Interactions between thrombin and anticoagulant components and to explore the active anticoagulants from two leech species. In this method NP-40 lysis buffer was used to extract the total proteins from *Whitmania pigra* Whitman and *Hirudo nipponica* Whitman, then Antithrombin activity of two leech species was determined by thrombin titration. It was found that both leech species the thrombin-active peptides was detected through Native-PAGE-WB, and the SDS-PAGE-WB found that the strips produced after the degeneration of the complex were the same as that of standard thrombin. It comes to the conclusion that the anticoagulants

from *Whitmania pigra* Whitman can form stable protein complexes with thrombin in vitro like hirudin.

Keywords: *Whitmania pigra* whitman, *hirudo nipponica* whitman, thrombin, Native-PAGE, anticoagulant, Western blot

(责任编辑:刘 宁,责任译审:王 昭)