

中药露蜂房水溶性蛋白 NV-PP-4 的分离纯化及部分理化性质鉴定

徐伟, 肖宣, 柳雪枚(中国协和医科大学 中国医学科学院药物研究所, 北京 100050)

摘要:目的: 从中药露蜂房抗炎活性有效部分纯化得到一酸性蛋白 NV-PP-4, 并鉴定了其部分理化性质。方法: 用 Sephadex G-50、DEAE-Sephadex A50、羟基磷灰石等柱层析及 HPLC 等方法纯化, 并以 HPLC、毛细管等电聚焦电泳、氨基酸自动分析等手段, 鉴定其理化性质。结果: NV-PP-4 经不同的 HPLC 柱和不同的流动相均表明为一对称单一峰、毛细管等电聚焦电泳呈单一染色带。亲水型分子排阻 HPLC 测定其分子量为 8.711KD, 毛细管等电聚焦电泳测定其等电点为 1.79, 氨基酸分析表明 NV-PP-4 含有 87 个氨基酸残基, 其中 Gly、Asp、Pro、Glu 等含量较多。结论: NV-PP-4 是从中药露蜂房中首次分离得到的酸性蛋白质成分。

关键词: 露蜂房; 酸性蛋白质; 分离纯化

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

文章编号: 1006-0111(2000)05-0284-02

Isolation, Purification and characterization of NV-PP-4 from *Nidus Vespae*

ABSTRACT: OBJECTIVE: To isolate and purify a new protein, nominated as NV-PP-4 from the anti-inflammatory of *Nidus Vespae* and study its characteristics. **METHODS:** It was purified by Sephadex G-50 chromatography, followed by DEAE-Sephadex A50 anion exchange chromatography, hydroxyapatite column chromatography and high performance liquid chromatography, then it was characterized by HPLC, HPCE, amino acid analysis. **RESULTS:** HPLC and IEF-HPCE showed that it was homogenous both in molecular weight and electric charge, its molecular weight was determined to be 8.711KD by HPLC. Its PI was estimated to be 1.79 by IEF-HPCE. Amino acid analysis showed that it consists of 87 amino acids and it was rich in Gly, Asp, Pro, Glu. **CONCLUSION:** NV-PP-4 was a new protein purified from the water extract of *Nidus Vespae*.

KEY WORDS: *nidus vespae*; protein; purification; characteristics

露蜂房是我国传统动物中药,早在两千年前的“神农本草经”中就有记载,主要有祛风解毒、散肿止痛等功效,用于治疗疔疮肿毒、乳腺炎、风湿等症^[1]。近年来,一些老中医治疗恶性肿瘤的药方中常见用露蜂房^[2,3],药理实验也证明露蜂房制剂对某些恶性肿瘤(肺癌、胃癌、子宫癌等)具有治疗作用,水提取物对小鼠急性炎症、小鼠肉瘤 180 的生长确有一定抑制作用。露蜂房虽在历代本草中均记载有毒,但临床应用常规剂量时,毒副作用很轻,未发现有严重中毒的报道。根据露蜂房的临床应用及药理筛选结果,我们用制备型等电聚焦电泳、分子排阻层析、凝胶离子交换层析、羟基磷灰石柱层析、HPLC、超薄等电聚焦电泳及 HPCE 等分离、纯化和鉴定等手段,首次从露蜂房水提取物中分离纯化得到一酸性蛋白,命名为 NV-PP-4,并鉴定了其部分理化性质。

1 材料、试剂及仪器

未经炮制的露蜂房生药; Gilson 高压液相系统; Hemle Z 360K 超速冷冻离心机; LKB 紫外检测仪; Waters 高效液相柱 Protein-PakTM60; Zorbax ODS 300 柱; Boehringer 蛋白质分子量标准品; Beckman 蛋白质等电点标准品; Pharmacia Sephadex G-50, DEAE-Sephadex A50; 国产分析纯 NaCl; 国产色谱纯乙腈。

2 分离纯化

2.1 原料的提取

露蜂房生药经剪碎后,置改良沙氏提取器中,以 95% 乙醇脱脂 24 小时。脱脂后挥尽乙醇的露蜂房碎块,于 4℃ 蒸馏水中冷浸三次,每次 24 小时。合并提取液,过滤、减压浓缩后冷冻干燥。

2.2 水提物的粗分离

将露蜂房的水提取物上样于 Sephadex G-50 层析柱,以水为洗脱液,柱上分离为 6 条色带,收集色带 3 部分。减压浓缩后冻干。

以 0.01M pH=6.8 磷酸缓冲液预平衡 DEAE-Sephadex A50 柱,然后将带 3 样品上柱,顺序以 0.01M⁻→0.05M⁻→0.1M⁻→0.2M 磷酸缓冲液进行梯度洗脱,收集 0.2M 洗脱部分,减压浓缩、透析、冻干。

2.3 NV-PP-4 的分离纯化

2.3.1 Sephadex G-75 柱层析 将 0.2M 磷酸缓冲液洗脱部分上样于 Sephadex G-75 柱,以 0.1M NaCl 洗脱,收集峰 2 的峰尖部分,浓缩、透析、冻干。

2.3.2 羟基磷灰石柱层析 取峰 2 上样于羟基磷灰石柱,依次用 H₂O⁻→0.005M⁻→0.01M⁻→0.05M⁻→0.1M⁻→0.2M 的 NaH₂PO₄·N₂HPO₄ (pH=6.4) 缓冲液洗脱。收集 H₂O

洗脱的样品, 浓缩、冻干。

2.3.3 HPLC 进一步纯化 使用排阻极限为100KD 的 TSK 2000SW 柱对羟基磷灰石柱 H₂O 洗脱的样品进一步纯化。采用 Gilson 高压液相系统, 以 0.9% NaCl 为洗脱液, 其吸收峰如图1所示, 收集保留时间 $T_r = 10.09$ 的峰。透析脱盐后, 再次上 TSK 柱进行纯化, 洗脱液为 1.5% NaCl, 收集所示峰尖部分, 透析、冻干, 即得 NV-PP-4。

3 理化性质鉴定

3.1 NV-PP-4 的纯度鉴定

3.1.1 HPLC 法 采用 Protein Pak™ 60 柱, 以 0.9% NaCl 为流动相, NV-PP-4 的色谱。采用 Zorbax ODS 300 柱, 以 5% 乙腈为流动相, 流速为 1.0ml/min。

3.1.2 毛细管电泳法 采用 BECKMAN 高效毛细管电泳仪和 eCAP™ cIEF 3-10 Kit。样品液从阳极灌入, 实验中先用去离子水冲洗柱子, 然后采用低压冲洗方式上样, 聚焦后用低压推出。

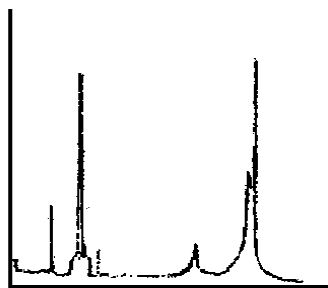
3.2 NV-PP-4 的分子量测定

采用 Gilson 高压液相系统, TSK2000SW 亲水性排阻色谱柱, 以 1.5% NaCl 为流动相, 分别测定四种标准品的保留时间和 NV-PP-4 的保留时间, 以分子量的常用对数 $\log MW$ 对保留时间 (T_r / min) 作图, 求得回归方程和线性回归系数, 根据回归方程计算出 NV-PP-4 的分子量。

3.3 NV-PP-4 的等电点测定

采用 BECKMAN 高效毛细管电泳仪和 eCAP™ cIEF 3-10 Kit, 测定 NV-PP-4 的等电点。得到各标准品相对于内标(本底吸收峰)的相对保留时间, 以标准蛋白的相对保留时间对其 PI 值进行线性回归, 相同条件下测出样品 NV-PP-4 的相对保留时间, 用随机软件得到其 PI 值。

3.4 NV-PP-4 的氨基酸组成分析



等电聚焦毛细管电泳

图 1 NV-PP-4 的等电点测定

分析结果见表2。表明 NV-PP-4 含有87个氨基酸残基, 其中 Gly, Asp, Pro, Glu 等含量较多。

表 2 NV-PP-4 的氨基酸组成分析

氨基酸	理论值	氨基酸	理论值	氨基酸	理论值
Asp	12	Thr	9	Ser	8
Glu	10	Gly	14	Ala	6
Val	4	Ile	3	Leu	3
Tyr	1	Phe	1	Lys	3
His	1	Arg	2	Pro	10

采用日立 L-850 氨基酸自动分析仪进行 NV-PP-4 的氨基酸组成分析。

4 结果与讨论

4.1 NV-PP-4 的纯化

经纯化得到分子大小和带电性均一的样品 NV-PP-4, 收率为生药的百万分之 8.5。

4.2 NV-PP-4 的纯度鉴定

经 HPLC 亲水性排阻和反相色谱柱测定, NV-PP-4 均呈一对称单峰。HPCE 也呈单一峰, 表明 NV-PP-4 达到 HPLC 色谱和 HPCE 色谱纯。

表 1 分子量标准及 NV-PP-4 的分子量及保留时间

标准品	分子量	分子量对数	保留时间
glutamate dehydrogenase	55400	4.7435	7.43
Albumin	45000	4.6532	8.21
Lactate dehydrogenase	36500	4.5622	8.58
Aprotinin	6500	3.8129	12.69
NV-PP-4	8700.5		12.01

4.3 NV-PP-4 的相对分子量

以蛋白质分子量标准品的分子量常用对数对其保留时间进行线性回归, 求得线性回归方程为 $\log MW = -0.1807Tr + 6.1104$, $r^2 = 0.9982$ 。把 NV-PP-4 的保留时间 $T_r = 12.01$, 代入上述方程, 求得其分子量为 8.711KD。见表 1。

4.4 NV-PP-4 的等电点

经毛细管电泳随机软件求得 NV-PP-4 的等电点为 1.97。见图 1。

4.5 NV-PP-4 的氨基酸组成

等电点标准品和 NV-PP-4 及等电点

等电点标准点	等电点(PI)
Ribonucleasa A	9.45
Carbonic Anhydrase II	5.9
β -Lactoglobulin	5.1
CCK Flanking Peptide	2.75
NV-PP-4	1.79

参考文献:

[1] 高士贤. 中国动物药志[M]. 吉林科学技术出版社, 1996: 319.
 [2] 孙志贤. 现代生物化学理论与研究技术[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1995.
 [3] 朱彭玲. 现代液相色谱[M]. 兰州: 兰州大学出版社, 1989.
 [4] 方福德. 现代医学实验技术全书[M]. 1995, 537- 549.