



太湖蓝藻水华胰蛋白酶抑制剂和 凝血酶抑制剂的测定

敖宗华, 陶文沂, 汤晓智, 孙微, 许正宏
(江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 为配合太湖蓝藻的收集处理,研究了蓝藻水华的资源化可能,在前期工作的基础上,通过层析分离并结合活性测定,发现太湖蓝藻水华中有多种胰蛋白酶和凝血酶抑制剂。

关键词: 太湖蓝藻水华;胰蛋白酶抑制剂;凝血酶抑制剂

中图分类号:Q 949.2

文献标识码:A

Determination of the Trypsin and Thrombin Inhibitors in the Water Bloom from Taihu Lake

AO Zong-hua, TAO Wen-yi, TANG Xiao-zhi, SUN Wei, XU Zheng-hong
(School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: By chromatography and the detection of inhibition enzyme activity, a few kinds of trypsin inhibitors and thrombin inhibitors were found in the water bloom from Taihu Lake.

Key words: Water bloom from Taihu Lake; trypsin inhibitors; thrombin inhibitors

太湖流域是我国经济发达地区之一,太湖流域水质的状况与周边地区的经济发展和人民生活密切相关。然而进入20世纪90年代,太湖流域水质的严重富营养化,导致每年蓝藻水华大量爆发,使太湖水质严重恶化,影响了环太湖流域的经济发展,迄今太湖水质仍无好转迹象。而通过收集、去除蓝藻水华在改善太湖水质上有较好的效果,此方法在日本的霞浦湖已得到大规模的应用^[1]。

产生太湖蓝藻水华的蓝藻属微囊藻属 *Microcystis*。国际上近十年来已从中分离得到多种酶抑制剂,包括胰蛋白酶抑制剂、胰凝乳蛋白酶抑制剂、弹性蛋白酶抑制剂、凝血酶抑制剂,血管紧张素转化酶抑制剂等。所发现的酶抑制剂为多肽类化合物,结构

新颖、活性强,是优秀的新药先导化合物^[2]。为配合蓝藻水华的收集处理工作,对太湖蓝藻水华的资源化作了相应的研究。前期工作发现太湖蓝藻水华的提取物粗品有较强的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶抑制活性^[3],作者对其中胰蛋白酶和凝血酶抑制活性组分进行了相应研究,发现其中有多种酶抑制剂。

1 材料与amp;方法

1.1 材料和试剂

蓝藻 采自无锡太湖梅梁湖水域,经喷雾干燥制成干粉;胰蛋白酶,华美生物工程公司产品。TAME(对苯甲磺酰-L-精氨酸甲酯酸盐)和BTEE(苯甲酰-L-酪氨酸乙酯),上海丽珠东风生物技术

公司产品;凝血酶及凝血酶底物 Chromozym TH(N-P-TOSYL-GLY-PRO-ARG, Sigma 公司产品;薄层层析、快速柱层析所用填料为硅胶 G,青岛海洋化工厂产品;乙醇、氯仿为工业级,其余试剂为分析纯。

1.2 分离纯化

分离纯化流程如下:

蓝藻干粉 + 80% 乙醇浸提 → 浸提液过滤 → 浓缩 → 氯仿萃取除杂 → 正丁醇萃取 → 浓缩干燥 → 正丁醇相硅胶常压柱层析 → 氯仿-甲醇梯度洗脱 → TLC 检测,按 R_f 值从高到低收集组分,分别编为 Tc1~Tc8 → 将 Tc6, Tc7 用快速柱层析,得到含量较大、组分较纯的 Tc61、Tc62、Tc71 → 进一步分离纯化 → 浓缩,冷冻干燥得纯品。

TLC 所用层析板自制,载玻片 25 mm × 75 mm,硅胶 G,室温干燥,未活化。以氯仿-甲醇混合液展开,碘熏显色。

最后纯化所用仪器为 AKTA explorer 100,分析柱为 resource-15RPC-3 mL(4.6 mm × 100 mm),制备柱 resource-15RPC-100 mL(25 mm × 100 mm)。分析与纯化采用质量分数不同的乙腈溶液梯度洗脱(A液:0.05% CH₃COOH 水溶液, B液:50% CH₃CN + 0.05% CH₃COOH 水溶液),检测波长为 220 nm,分析所用流量为 1 mL/min,制备所用流量为 10 mL/min。

1.3 酶抑制活性的测定

胰蛋白酶抑制活性、凝血酶抑制活性的测定参照文献[4,5]改进后进行。

2 结果与讨论

2.1 样品的液相纯化

依据活性测定结果,将含量较大、活性较高的组分 Tc61、Tc62、Tc71 进行分析,结果见图 1~3。

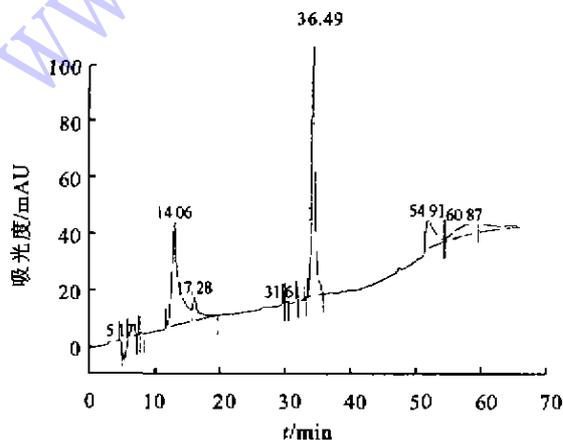


图 1 Tc61 的分析图谱

Fig.1 Analysis chromatography of Tc61

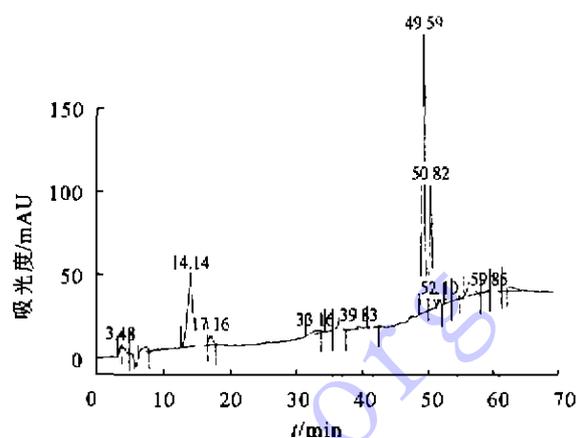


图 2 Tc62 的分析图谱

Fig.2 Analysis chromatography of Tc62

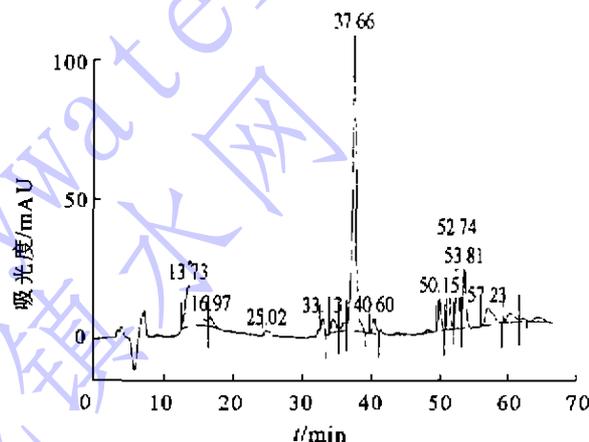


图 3 Tc71 的分析图谱

Fig.3 Analysis chromatography of Tc71

根据分析结果,改进了制备条件,收集了其中含量较大组分 Tczb3~Tczb7 作进一步的活性测定。

2.2 胰蛋白酶和凝血酶抑制活性测定结果

所得样品 Tczb3~Tczb7 对胰蛋白酶和凝血酶的抑制 IC₅₀ 如表 1 所示。

表 1 各化合物对胰蛋白酶和凝血酶抑制活性

Tab.1 The inhibition activities of each compounds

	(μg/mL)				
类别	Tczb3	Tczb4	Tczb5	Tczb6	Tczb7
胰蛋白酶	0.39	1.59	4.21	3.37	3.38
凝血酶	1.87	-	-	10.12	1.92

注:“-”代表未测出抑制活性。

2.3 讨论

从以上实验结果可以看出,太湖蓝藻水华中含有多种胰蛋白酶和凝血酶抑制剂,且其体外抑制活性强,达到微克级。进一步的结构测定与推导正在进行之中。



(上接第 306 页)

中国地域辽阔,发生水华的蓝藻可能会有不同的株系,甚至是不同的种或属.因此,从发现新药先导化合物的角度出发,蓝藻水华所产生的生理活性

物质值得关注.

致谢 无锡市林洲干燥设备有限公司协助作者进行了蓝藻水华喷雾干燥,作了大量的工作,谨此感谢.

参考文献:

- [1] 张晓江.日本霞浦湖微囊藻的处理与资源化[J].环境导报,1996,2(4):41-45.
- [2] 敖宗华,陶文沂,许正宏等.微囊藻属多肽类酶抑制剂研究进展[J].天然产物研究与开发,2000,12(4):79-83.
- [3] 敖宗华,许正宏,孙微等.不同提取方法对太湖蓝藻水华胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶抑制活性的影响[J].无锡轻工大学学报,1999,18(6):145-147.
- [4] B.施特马赫著.酶的测定方法[M].北京:轻工业出版社,1992.
- [5] 韩玉珉,葛庆远,王增丰.重组水蛭素的纯化和鉴定[J].生物化学杂志,1991,7(6):657-661.

(责任编辑:朱明)