微囊藻毒素-RR 的纯化及鉴定

张永路, 黄夏宁, 肖雯晴, 钟 晴, 谷康定*

(华中科技大学同济医学院公共卫生学院环境医学研究所 教育部环境与健康重点实验室, 湖北 武汉 430030)

摘要:将固相萃取和凝胶色谱技术相结合,建立了以野外采集的水华蓝藻为原料提取和纯化微囊藻毒素-RR(MC-RR)的有效方法。用70%的甲醇溶液溶解35 g藻浆,经离心等系列处理,得粗提液,旋转蒸发去除甲醇;粗提液经HLB柱固相萃取后,得到7.5 mL洗脱液,然后将其浓缩至2 mL,再用Sephadex LH-20凝胶色谱柱分离纯化,洗脱液分管收集,用紫外分光光度计测定每管洗脱液在238 nm的吸收值,并绘制洗脱曲线。使用高效液相色谱对峰值组分进行鉴定,同时利用紫外分光光度计对毒素的光谱特征进行鉴定。最终获得3.65 mg纯度超过90%的MC-RR样品,产品得率为74.1%。其紫外吸收光谱在238 nm处有特征吸收,证明所纯化的样品为MC-RR。

关键词:固相萃取;凝胶色谱;微囊藻毒素-RR(MC-RR);纯化

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2013)03-0260-04

Purification and identification of microcystin-RR

ZHANG Yonglu, HUANG Xianing, XIAO Wenqing, ZHONG Qing, GU Kangding*

(Key Laboratory of Environment and Health of Ministry of Education, Institute of Environmental Medicine, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: An effective method based on the combination of solid phase extraction and gel chromatography to extract and purify microcystin-RR (MC-RR) from natural cyanobacteria bloom was developed. Thirty five gram natural cyanobacterial bloom scum was extracted with 70% aqueous methanol. After the methanol in the crude extract was removed by a rotary evaporator, the solid phase extraction was used for preliminary purification and concentration. And then 7.5 mL eluent was concentrated to 2 mL and loaded onto a Sephadex LH-20 gel chromatographic column for further purification. The eluate was collected by tubes and detected at 238 nm. The elution curve was plotted by tube numbers as X-axis and the absorbance at 238 nm as Y-axis. The purity and the spectral characteristics of the final extract were identified with high performance liquid chromatograph (HPLC) and spectrophotometer, respectively. A total of 3.65 mg of MC-RR with a final yield of 74.1% was obtained, and the purity was more than 90% with characteristic UV absorption spectra at 238 nm.

Key words: solid phase extraction; gel chromatography; microcystin-RR (MC-RR); purification

近年来,水体富营养化引起的蓝藻水华污染已引起全球关注,水华发生时,最主要的危害是蓝藻向水体中释放多种不同类型的毒素,其中以微囊藻毒素(MCs)最为普遍,且与人体健康关系最为紧密。MCs能够特异性地与蛋白磷酸酶PP1和PP2A的丝氨酸/苏氨酸亚基结合,从而抑制它们的活性,促进肿瘤的发生。流行病学调查显示,MCs与原发性

肝癌的发病率有显著的相关性^[1]。MCs是一组环状七肽类物质,相对分子质量为1 kDa左右,共同结构为Ala-X-MeAsp/Asp-Z-Adda-Glu-Mdha/Dha环,其中X、Z为2种可变的L-氨基酸^[2]。由于X和Z的不同以及Asp和Dha的甲基化,可以形成多种变体,迄今为止,至少已发现80种以上的MCs^[3],其中在我国较为普遍的是微囊藻毒素-RR(MC-RR)和

* 通讯联系人. E-mail:hygkd@mails.tjmu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金项目(20977038)。

收稿日期:2012-11-19

MC-LR^[4]。与MCs相关的毒理学、免疫学等相关研究对藻毒素的纯度要求很高,以排除杂质对结果的干扰。但是到目前为止,研究所需的纯品一般需进口且价格昂贵,因此需要探索一种快捷、有效、产品得率较高的提取纯化方法。目前,微囊藻毒素纯化的方法有快速色谱法^[5]、薄层色谱法^[6]、凝胶色谱法^[7]、离子交换色谱法^[8]、制备型高效液相色谱法^[9]、超临界萃取法^[10]等,但各有其优劣处。本研究利用天然水华蓝藻为原料,采用70%的甲醇溶液提取,并通过固相萃取,Sephadex LH-20凝胶色谱分步纯化,得到纯度超过90%的MC-RR。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

分别于2011年9月在武汉市中山公园和2012年8月在武汉市菱角湖用25#浮游生物网采集大量水华蓝藻,带回实验室后,离心除去水分,得到浓稠的藻浆,于-20℃保存备用。微囊藻毒素标准品MC-LR和MC-RR(纯度>95%,美国Enzo Life Science公司),Sephadex LH-20填料(美国GE Healthcare公司),甲醇(色谱纯,美国Sigma公司),三氟乙酸(色谱纯,购自国药集团化学试剂有限公司),OASIS HLB固相萃取小柱(200 mg/6 mL,美国Waters公司)。

Waters Alliance-2695型高效液相色谱仪,配有Waters-2996型二极管阵列检测器(DAD)(美国Waters公司),Agilent ZORBAX SB-C18色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm,美国Agilent公司),旋转蒸发仪(德国Heidolph公司),BSZ-100自动部分收集器,DHL-A电脑数显恒流泵(上海沪西分析仪器有限公司),台式高速大容量离心机(德国Eppendorf公司)。

1.2 藻毒素的提取

采用70%的甲醇提取法^[11],分别取中山公园和菱角湖藻浆各35 g,加入200 mL 70%(体积分数)以下未做说明者均同此)甲醇溶液,以120 r/min的转速,磁力搅拌40 min;随后以9 500 g离心溶解液10 min,然后收集上清液,向沉淀中加入200 mL 70%甲醇溶液,重复上述过程,合并上清液。用稀HCl将上清液pH值调至4左右^[12],然后静置1 h,待溶液中出现大量絮状沉淀后,以9 500 g离心15 min,弃去沉淀,得到浅黄色上清液。用稀氨水将该溶液pH值调至7,然后在40℃的条件下真空旋转蒸发,去除甲醇后将粗提液依次通过0.45 μm、0.22 μm的微孔滤膜过滤,待后续固相萃取对其进

一步纯化。

1.3 藻毒素的富集

分别用10 mL纯甲醇和10 mL超纯水活化固相萃取小柱后,将粗提液以4 mL/min流速通过固相萃取小柱进行浓缩富集,然后依次用20 mL的20%和30%的甲醇溶液淋洗,最后用7.5 mL 100%甲醇洗脱,随即用高效液相色谱(HPLC)分析确定其毒素类型和含量。然后将洗脱液旋转蒸发浓缩至2 mL。

1.4 藻毒素的纯化

Sephadex LH-20色谱柱(50 cm×2.6 cm)预先用200 mL甲醇平衡,然后将前述已浓缩至2 mL的洗脱液经0.22 μm滤膜过滤后上样,以甲醇为流动相,流速为1 mL/min,用自动部分收集器收集洗脱液,每管收集10 mL,用紫外分光光度计测定每管洗脱液在238 nm的吸收值。以吸收值 $A_{238\text{ nm}}$ 为纵坐标,以每管编号为横坐标绘制洗脱曲线图。

1.5 HPLC条件

流动相:甲醇-0.05%三氟乙酸水溶液(体积比为65:35);进样量:10 μL;流速:1 mL/min;色谱柱恒温箱温度:40℃;检测波长:238 nm。将MC-RR、MC-LR标准品用30%的甲醇溶液配制成0.1、1.0、5.0、10.0、20.0、40.0 mg/L 6个不同质量浓度的标准溶液,根据其响应的峰面积确定标准曲线。

2 结果和讨论

2.1 藻毒素的提取及含量的测定

在中山公园和菱角湖采集的水华蓝藻均能产生MC-RR和MC-LR这两种微囊藻毒素,并且以MC-RR为主。二者的色谱图基本相似,如图1所示。35 g的藻浆用70%的甲醇溶液提取得到粗提液,经固相萃取后,中山公园藻浆得到4.92 mg MC-RR以及0.53 mg MC-LR,而菱角湖藻浆仅得到0.22 mg MC-RR及0.03 mg MC-LR。根据近年来的相关报道,以太湖^[13]、滇池^[5]和东湖^[14]的水华蓝藻为原料,提取的藻毒素均以MC-RR为主,本研究结果与上述报道一致。研究表明,水体中水华蓝藻种群是由产毒藻类和非产毒藻类组成的“混合种群”,产毒藻类种群丰度是动态变化的,受到氮、磷、温度、光照以及水体中微生物等多种环境因子的影响^[15]。本研究中,中山公园水华蓝藻产生藻毒素量是菱角湖的22倍。光学显微镜下显示,中山公园水体中水华蓝藻以铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)等产毒藻类为主,而菱角湖水体中水华蓝藻以惠氏微囊藻(*Microcystis wesenbergii*)等非产毒藻类为主。

图 1 (a)菱角湖、(b)中山公园水华蓝藻粗提液固相萃取后的 HPLC 谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of the samples from (a) Lingjiao Lake and (b) Zhongshan Park after solid phase extraction
1. MC-RR; 2. MC-LR.

2.2 Sephadex LH-20 凝胶色谱对 MC-RR 的分离纯化

MC-RR 粗提液经固相萃取初步纯化和浓缩后,用 Sephadex LH-20 凝胶色谱进一步纯化。洗脱曲线显示,共得到 3 个组分,如图 2 所示。经过 HPLC 分析,第一个洗脱峰(第 10 ~ 15 管)为 MC-RR 洗脱峰,第 12 号管开始出现 MC-RR、MC-LR 以及保留时间在 5 min 左右的未知物质,第 13 号管、14 号管除了在 4.5 min 左右有一少量未知物质外,绝大部分成分为 MC-RR(见图 3)。第二个洗脱峰(第 16 ~ 20 管)的流出液为浅黄色,不含微囊藻毒素成分,说明 Sephadex LH-20 凝胶色谱能有效地去除部分色素和杂质。第三个洗脱峰为其他杂质。本实验实际

图 2 Sephadex LH-20 凝胶色谱对提取物的洗脱曲线
Fig. 2 Elution curve of the extract through Sephadex LH-20 gel chromatography

图 3 图 2 中第一个洗脱峰的第 12、13、14 管洗脱液的 HPLC 谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of the 12th, 13th and 14th tubes of the first elution peak in Fig. 2

洗脱过程与效果表明 MC-LR 洗脱先于 MC-RR,表明二者能够有效分离。利用 Sephadex LH-20 分离洗脱掉 MC-LR 后,虽然可能损失一部分 MC-RR,但可以达到纯化后者的目的。

2.3 MC-RR 的最终得率和纯度鉴定

以中山公园采集的水华蓝藻为原料,35 g 的藻浆用 200 mL 70% 的甲醇溶液提取得到粗提液,固相萃取后得到 7.5 mL 含有 4.92 mg MC-RR 以及 0.53 mg MC-LR 洗脱液,然后将其浓缩至 2 mL,上样至 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱分离纯化,得到 3.65 mg 的纯度超过 90% 的 MC-RR, MC-RR 的得率为 74.1%。为了验证所纯化的物质为 MC-RR,除了将纯化得到的 MC-RR 与 MC-RR 的标准品色谱图比较外(见图 4),还进行了光谱图的对比。MC-RR 标准品与纯化得到的 MC-RR 在 200 ~ 600 nm 之间的扫描光谱图如图 5 所示,纯化得到的 MC-RR 在 238 nm 左右有最大吸收峰,与标准品一致,证明纯化得到的物质为 MC-RR。

王金丽等^[8]先用 Sephadex LH-20 凝胶色谱柱

图 4 (a) MC-RR 标准品及 (b) 纯化得到的 MC-RR 的色谱图
Fig. 4 HPLC chromatograms of (a) MC-RR standard and (b) purified MC-RR

图 5 (a) MC-RR 标准品和 (b) 纯化得到的 MC-RR 的光谱图
Fig. 5 Optical spectra of (a) MC-RR standard and (b) purified MC-RR

纯化,再用 DEAE Sepharose CL-6B 阴离子交换色谱法得到纯度 >90% 的 MC-LR,整个纯化过程 MC-LR 的得率为 66.2%。该方法步骤较多,纯化过程中靶物质损失也可能较多。Phelan 等^[7]用 Sephadex

LH-20 凝胶色谱初步纯化,最后用制备型液相色谱分离纯化 MC-LR,整个过程得率仅为 33%,且制备型液相色谱及分离柱价格昂贵,一般实验室很难配备。目前还未见用 Sephadex LH-20 凝胶色谱法纯化 MC-RR 的报道,本研究在此方面进行了有益的尝试,获得满意效果。

3 结论

本研究以野外采集的水华蓝藻为原料,建立了以 70% 甲醇提取,固相萃取和 Sephadex LH-20 凝胶色谱为主要步骤的 MC-RR 分离纯化方法。本方法步骤少,效果好,操作简单,回收率高。研究还提示,中山公园的蓝藻以铜绿微囊藻占优势,产毒量高,且以 MC-RR 为主。可尝试对该藻进行分离培养,以获得稳定的蓝藻来源。

参考文献:

[1] Fan S, Zhao R, Li B, et al. Chinese Journal of Chromatography (范赛, 赵榕, 李兵, 等. 色谱), 2012, 30(5): 434
[2] Zhang M, Tang F L, Chen F, et al. Chinese Journal of Chromatography (张明, 唐访良, 陈峰, 等. 色谱), 2012, 30(1): 51
[3] Li H Y, Xie P, Li G Y, et al. Toxicon, 2009, 53(1): 169
[4] Shen P P, Shi Q, Hua Z C, et al. Environ Int, 2003, 29(5): 641
[5] Chen X G, Xiao B D, Xu X Q. China Environmental Science (陈晓国, 肖邦定, 徐小清. 中国环境科学), 2005, 25(3): 267
[6] Lee T H, Chou H N. Bot Bull Acad Sin, 2000, 41(2): 197
[7] Phelan R R, Downing T G. Afr J Biotechnol, 2007, 6(21): 2451
[8] Wang J L, Liang W Y, Chen L. Journal of Beijing Forestry University (王金丽, 梁文艳, 陈莉. 北京林业大学学报), 2010, 32(2): 184
[9] Miao H F, Qin F, Tao G J, et al. Chemosphere, 2010, 79(4): 355
[10] Pyo D J, Oh C S, Choi J C. Anal Lett, 2004, 37(12): 2595
[11] Saqrane S, El Ghazali I, Oudra B, et al. Toxicon, 2009, 53(1): 9
[12] Wei T, Xiang Z, Feng X G, et al. Guangzhou Environmental Sciences (卫涛, 向铮, 冯小刚, 等. 广州环境科学), 2007, 22(4): 10
[13] Chen P, Fang S H, Wang C Y, et al. Chinese Science Bulletin (陈鹏, 方淑红, 王春英, 等. 科学通报), 2012, 57(11): 898
[14] Tang H F, Sun Q, Mu T, et al. Chemistry & Bioengineering (唐红枫, 孙茜, 穆婷, 等. 化学与生物工程), 2011, 28(1): 82
[15] Li D M, Kong F X, Yang Z, et al. Acta Scientiae Circumstantiae (李大命, 孔繁翔, 阳振, 等. 环境科学学报), 2011, 31(12): 2672