

眼镜王蛇蛇毒的柱层析分离 及神经毒组份的研究

蔡景霞 孙欣 杨长久 陈锡兰
李朝达 赵其昆 田云芬 熊郁良

(中国科学院昆明动物研究所)

摘 要

用羧甲基葡聚糖C—25和氯化钠直梯梯度洗脱方法,对我国广西产眼镜王蛇蛇毒进行了柱层析分离,获得了17个蛋白峰,测定了17个蛋白峰的毒性和生理活性。结果表明有7个毒性峰,其中6个峰具有阻断神经—肌肉接头传递的作用,另一个峰毒性很小,在相同剂量下也不表现上述作用。

眼镜王蛇 (*Ophiophagus hannah*) 属于眼镜蛇科、王蛇属,是世界上最大的毒蛇,排毒量也最大 (Tu., 1977)。此种蛇在我国南部、印度、印度支那、泰国、澳洲和菲律宾的吕宋岛东部均有分布。Joubert (1973) 用羧甲基纤维素和葡聚糖G—50凝胶过滤法,分离了泰国所产眼镜王蛇蛇毒,并纯化了其中两个神经毒素 (toxin a 和 toxin b), 还测定了它们的氨基酸组成。但在国内尚未见到有关眼镜王蛇蛇毒的系统研究报导。为充分利用国产蛇毒资源,我们对广西所产眼镜王蛇蛇毒进行了分离和活性研究。现将结果报导如下。

材 料 和 方 法

蛇毒: 系1968和1978年采自广西,经冷冻干燥成粉末,保存备用。

试剂: 羧甲基葡聚糖C—25系Pharmacia产品,其它均为国产A.R试剂。

方法: 分离组份的蛋白浓度用国产715型分光光度计测定,波长为280nm。

毒性测定: 将层析各组份稀释成每0.2毫升含蛋白50微克和10微克两种浓度,给体重 18 ± 2 克的小白鼠腹腔注射0.2毫升,5只小白鼠为一组,观察24小时内死亡数,对

有毒性的组份按改良寇氏法测定LD₅₀ (顾汉颐, 1965)。

生理活性测定, 神经毒组份的测定采用Bülbring的方法。

结 果

一、柱层析:

本文采用的柱层析分离条件是, 羧甲基葡聚糖C—25用0.05M醋酸钠缓冲液(pH5.8)浸泡上柱并平衡。柱高60厘米, 内径2.5厘米。广西产眼镜王蛇蛇毒1克溶于9毫升上述缓冲液中上柱。洗脱分三步进行, 第一步用平衡缓冲液洗脱, 第二、三步加氯化钠直线梯度洗脱(具体洗脱条件如表1), 洗脱液用部分收集器收集, 每管6毫升, 每小时24毫升。

广西产眼镜王蛇蛇毒经上述条件的羧甲基葡聚糖C—25柱层析分离, 得到17个蛋白峰, 见图1。蛋白回收按光密度回收计算为107%。

表1 柱层析洗脱条件

	梯 度 I		梯 度 II		梯 度 III	
	搅拌瓶	贮存瓶	搅拌瓶	贮存瓶	搅拌瓶	贮存瓶
0.05M醋酸钠缓冲液(ml)	360	0	720	720	180	180
NaCl浓度(M)	0	0	0	0.43	0.43	0.64

二、毒性:

将17个蛋白组份按前述毒性测定法初筛, 结果5、7、8、9、11、12、13等七个蛋白组份使小鼠在24小时内全部或大部分死亡。其它蛋白组份在相同剂量下, 对小鼠无致死作用。七个蛋白组份的LD₅₀测定结果表明组份13的毒性最小, 组份7—12的毒性较大, 见表2。

表2 眼镜王蛇毒性组份的LD₅₀(S.P.)

毒性组份 (蛋白峰号)	5	7	8	9	11	12	13	粗 毒
LD ₅₀ (μg/g)	0.52 ± 0.019	0.21 ± 0.009	0.27 ± 0.009	0.26 ± 0.013	0.24 ± 0.011	0.41 ± 0.015	2	0.72

三、各分离组份的生理活性:

神经毒组份鉴定, 以大白鼠膈神经膈肌标本为材料。将标本置于盛有台氏溶液的双层水浴槽内, 溶液温度维持在28—30°C, 并通以氧气。用矩形电脉冲交替刺激膈神经和膈肌(刺激参数见文后图2注), 膈肌对间接刺激和直接刺激引起的收缩记录于烟鼓上。做好对照后, 向溶液中加入毒性组份, 观察膈肌收缩幅度的变化。结果表明峰5、7、8、9、11及12都可使膈肌对间接刺激的收缩幅度逐渐减小直至停止收缩, 但不影响膈肌对直接刺激的反应(如图2)。峰12在相同剂量下观察3小时, 未出现上述作用。当每毫升台氏液含5.5微克毒蛋白时, 峰7、8、9、11和12完全阻断神经肌肉接头传递

的时间, 大约在29—40分钟之间; 峰5完全阻断传递的时间约90分钟。

膈肌膈神经标本在峰5、7、8、9、11及12作用下, 当记录不到膈肌对间接刺激收缩的反应时, 向浴槽溶液中加入新斯的明(10ug/ml), 经1—2分钟后, 膈肌的收缩反应有部份恢复, 随后迅速转为抑制(图3)。

上述诸标本, 当记录不到膈肌对间接刺激的收缩反应时, 若用与浴槽内溶液温度相同的台氏液反复冲洗标本五次(约30分钟), 峰5的阻断作用能够极小地被解除, 峰7的阻断作用在个别实验中偶见有被极小地解除, 峰8、9、11、12的阻断作用在同样条件下, 均不能被解除(图4)。

用蛙腹直肌标本检查上述各神经毒组份对终板区肌膜的乙酰胆碱敏感性的影响(上海生理研究所, 1974), 当用上述含各神经毒组份的任氏液处理标本后(神经毒浓度与用于大白鼠膈神经膈肌标本相同, 处理时间也与阻断膈肌对间接刺激反应的时间相同), 蛙腹直肌对乙酰胆碱不再起反应, 当洗去神经毒组份后, 仅见峰12作用过的腹直肌对乙酰胆碱反应出现不完全地微小地恢复, 神经毒组份不引起蛙腹直肌收缩(图5)。

讨 论

我们用羧甲基葡聚糖C—25分离眼镜王蛇蛇毒, 得到17个蛋白峰, 其中有7个毒性峰。除峰13的毒性很小外, 峰5、7、8、9、11、12的毒性都较大, 都能使小鼠死于呼吸麻痹。经大白鼠离体膈神经膈肌标本检查, 证明峰5、7、8、9、11和12都具有阻断神经肌肉接头传递的作用。经蛙腹直肌检查又表明, 对乙酰胆碱效应有竞争性抑制作用, 且均不引起肌肉收缩。表明上述各蛋白峰是神经毒组份, 作用方式基本上与d—筒箭毒相似, 但新斯的明不能完全对抗其引起的接头传递阻滞, 且阻滞接头传递作用的可逆性较差, 却与d—筒箭毒不同。6个神经毒组份中, 组份5和7有微弱的可逆性, 组份8、9、11、12相对不可逆。

参 考 文 献

- 顾汉颐 1965 生物统计在药理学中的应用, 药理学(第一卷 总论)主编:
张昌绍等 人民卫生出版社 393页。
- 上海生理研究所 1974 科学研究论文及技术总结汇编(第三部分 神经肌肉生理学) 43—47页。
- Bulbring, E. 1946 Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm of the rat. *Br. J. Pharmac.* 1:38—61.
- Joubert E. J. 1973 The amino acid sequences of two toxins from *Ophiophagus hannah* (King Cobra) venoms. *Biochemica et Biophysica* 317: 85—93.
- Tu, A. T. 1977 *Venoms; Chemistry and molecular Biology*. New York,

**COLUMN CHROMATOGRAPHY FRACTIONATION OF
OPHIOPHAGUS HANNAH VENOM AND
STUDY OF NEUROTOXIC PEAKS**

Cai Jing-xia, Sun Xin, Yang Chang-jiu, Chen Xi-lan,
Li Chao-da, Zhao Qi-kun, Tian Yun-fen, Xiong Yu-liang.

(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

Abstract

We fractionated Chinese Guangxi *Ophiophagus hannah* venom by CM-Sephadex C-25 column chromatography. Linear gradient elution was carried out with NaCl. Seventeen protein peaks were obtained. Their toxicity and physiological activities were estimated. Of the seven toxic peaks, six had the effect of blocking the transmission of neuromuscle juncture. The other one was much less toxic. It didn't show such effect with the same dose.

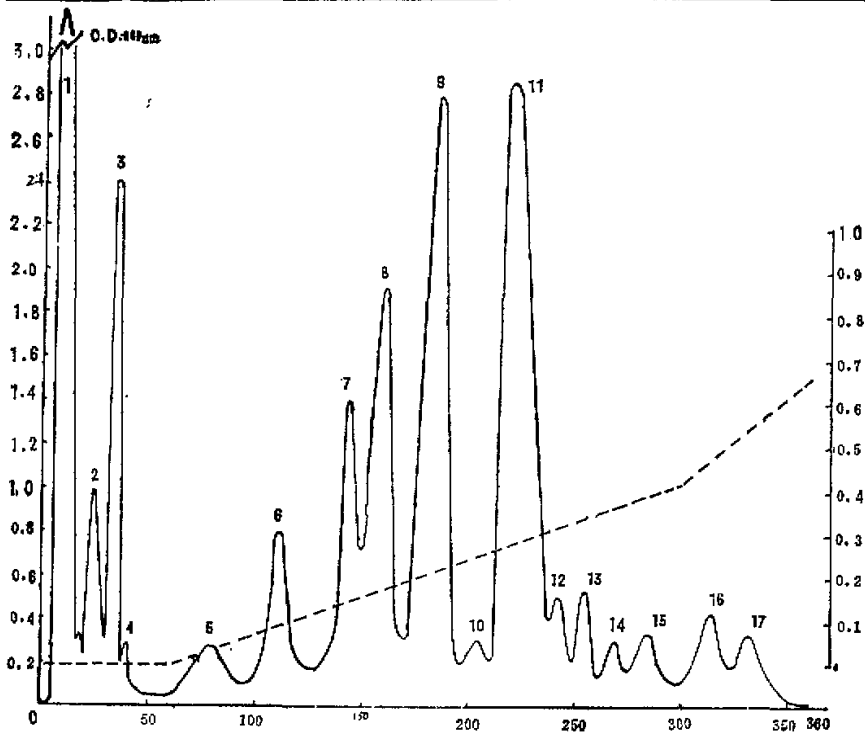


图1 眼镜王蛇蛇毒柱层析图谱

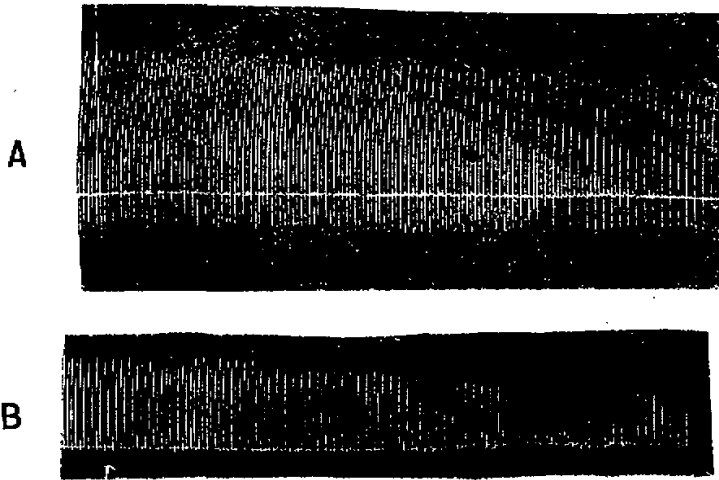


图2 大白鼠膈神经—膈肌标本 示神经毒组份鉴定

刺激参数：频率—6次/分，波宽—0.1ms、0.5ms，强度—超强度刺激。箭头处加入分离组份（5.5ug/ml），
 A为峰8， B为峰9。

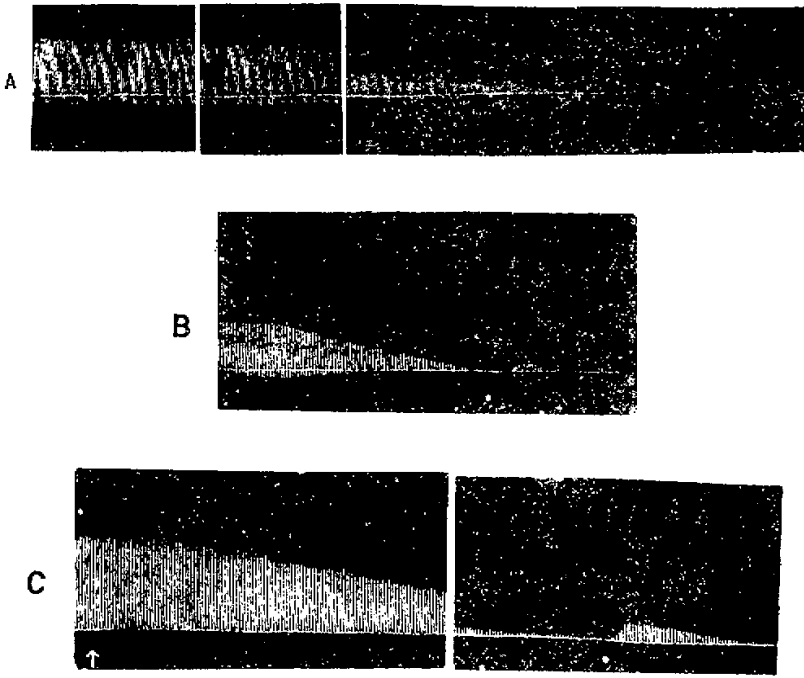
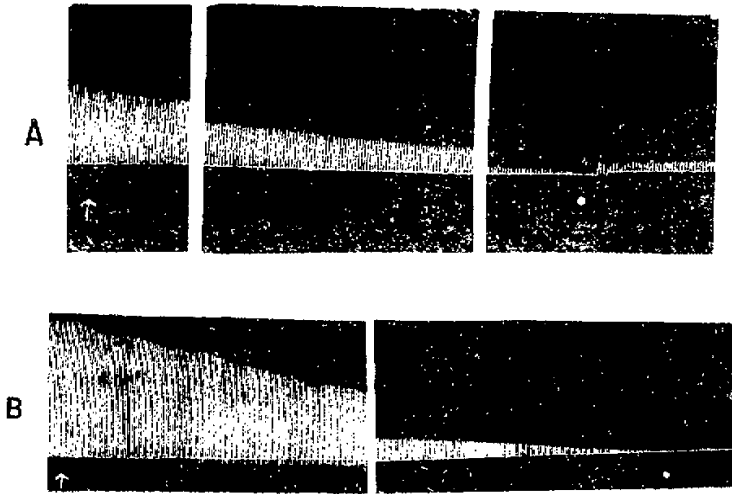


图3 大白鼠膈神经—膈肌标本 示新斯明对抗作用的测定
 刺激参数，同图1。 箭头处加入分离组份(5,5ug/ml) 圆点处加入新斯的明(10ug/ml)。
 A为峰5， B为峰7， C为峰8。



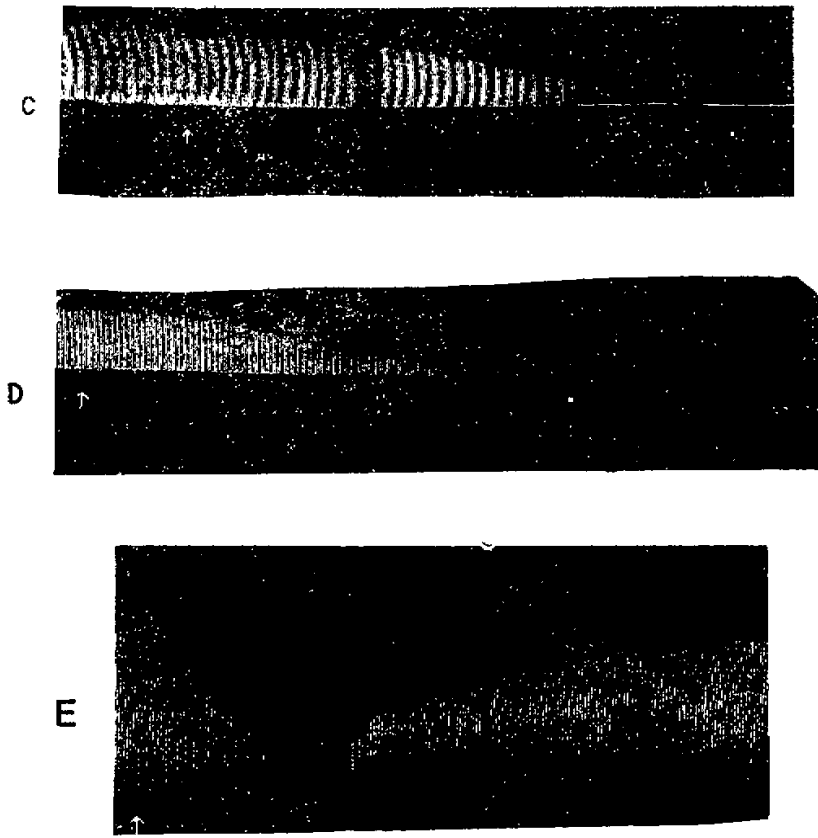


图4 大白鼠膈神经—膈肌标本 示可逆性检查。

刺激参数：同图1 箭头处加入分离组份 (5.5ug/ml) 圆点处冲洗
 A为峰5、 B为峰7、 C为峰11、 D为峰12、 E为箭毒



图5 青蛙腹直肌标本 示乙酰胆碱敏感度测定

箭头处加入分离组份 (5.5ug/ml) 圆点处冲洗
 A为峰11、 B为峰12