

眼镜蛇毒中蛋白质成分和微量元素锌、镁的分离

湖南中医学院中药系(长沙 410004) 彭新君* 王 娟 曾献秋** 周小兰**

摘要 用CMC-52柱和CM-Sephadex C-25柱分离了眼镜蛇*Naja naja* L.毒中的蛋白质及其金属离子 Zn^{2+} 和 Mg^{2+} ,分离出20多个蛋白峰,且能除去绝大多数蛋白组分中的Zn和Mg。还对一种毒性最强的不含金属离子的神经毒组分作了初步鉴定,用小鼠测得其半数致死量 $LD_{50}=0.092\text{mg/kg}$ 。

关键词 眼镜蛇毒蛋白质 锌 镁 阳离子交换柱色谱 紫外分光光度法 原子吸收分光光度法

眼镜蛇毒含有许多效应很强的有毒蛋白质(神经毒和心脏毒或细胞毒素)和生物酶及丰富的微量元素^[1~5]。本世纪初就发现眼镜蛇毒中含有异常高的微量元素锌($4.6\sim 5.6\times 10^3$)^[6,7]。随后发现眼镜蛇等蛇毒对卵黄的热凝固和脱水酶活性的阻障作用,可被 Zn^{2+} 强烈地抑制,开始了研究高含量锌在蛇毒中的生物学意义^[8],而且 Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 对眼镜蛇毒在狗眼的痛觉和炎症反应中都具有阻断作用^[9]。另外,眼镜蛇毒中的5-核苷酸酶活性受毒中 Zn^{2+} 的抑制,除去 Zn^{2+} ,其活性增加3倍,而 Mg^{2+} 则为该酶所必需^[10,11],也为该蛇毒中的心脏毒素Ⅱ(含 $\sim 4\text{mg/mol}$)的无机焦磷酸酶所必需^[12]。 Mg^{2+} 还能增加该蛇毒中乙酰胆碱酯酶的稳定性和活性^[13]。近年来国外利用柱色谱等分离方法和现代仪器检测手段来研究 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 等金属元素在眼镜蛇毒中及其各分离组分中的含量与毒素功能的关系。例如用活化分析法测定蛇毒透析液(含 $Zn 350\mu\text{g}$),得到在神经毒和出血毒中的分布分别为 ~ 420 和 $460\mu\text{g}$ ^[14],用同步加速器辐射法测定用阴离子交换色谱或凝胶色谱法分离的一些组分——神经毒、细胞毒和磷酸二酯酶中的多种金属元素含量^[15]。以上报道都提示眼镜蛇毒中的毒素或酶能结合 Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 而显示出各种功能。为研究该毒中各种蛋白成分中 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 与其镇痛消炎及酶活力等作用的关系,有必要制备脱 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 的蛋白成分。我们用CM-Cellulose和CM-Sephadex C-25阳离子交换柱色谱对眼镜蛇(*N. naja*)毒中的蛋白质组分和金属 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 进行了分离,以紫外吸收光度法和原子吸收光度法检测各组分。结果表明使用CM-Sephadex C-25柱色谱能从眼镜蛇毒中分离出20多个蛋白峰,且能除去绝大多数蛋白组分中的 Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 。对除去金属离子的一种神经毒组分作小鼠半数致死量测定,结果提示金属离子不影响该神经毒之毒性。

1 仪器与试剂

1.1 样品:湖南临湘人工喂养眼镜蛇(*N. naja*)毒结晶(下称湖南毒),上海花木公司动物采购站购得2批眼镜蛇毒粉末(下称上海毒)。

1.2 试剂和材料:CM-Cellulose(CMC-52,Whatman产品),CM-Sephadex C-25(Pharmacia产品,进口分装)。试剂均为优级纯,分析纯,光谱纯。所有试液均用去离子水配制,Tris-HCl(三羟甲基氨基甲烷)缓冲溶液用 CCl_4 -双硫腺萃取除去 Zn^{2+} 。3周龄小鸡,NIH种小鼠。

*Address: Peng Xinjun Department of Chinese Materia Medica, Hunan College of Traditional Chinese Medicine, Changsha

**分别为我院中药系90和91届毕业生

1.3 仪器：751G紫外分光光度计，WFX-110原子吸收分光光度计，70型离子交换纯水器，CX-205超声波清洗仪，pH计，BS-100A自动部分收集器，HL-I恒流泵，硬质玻璃色谱柱 $\phi 1.5 \times 40\text{cm}$ 和 $\phi 2 \times 50\text{cm}$ ，YSD-4型药理生理多用仪，二道生理记录仪。所有容器都经1:1硝酸浸泡，去离子水洗净后供使用。

2 方法和结果

2.1 CMC-52柱色谱：取湖南毒0.27g，用4ml pH7.2，0.01mol/L Tris-HCl缓冲溶液放置过夜溶解（冬天5~10℃），4000r/min离心10min，上清液加到由上述缓冲溶液平衡的CMC-52柱上（ $\phi 1.5 \times 40\text{cm}$ ），然后用320ml pH7.2，0.01mol/L Tris-HCl缓冲液和360ml 0.4mol/L NaCl（含上述缓冲液）作NaCl直线梯度洗脱。用分步收集器收集洗脱液，每10min一管，4.5ml/管，洗脱液以紫外分光光度计分别测定260nm和280nm处的吸收度（A），再用原子吸收光度计测定各管中的Zn、Mg浓度得洗脱曲线（图1）。且将所分离的主要蛋白峰处馏分中的Zn、Mg浓度列于表1。另外，用原子吸收法测得第4、10、330、342管有0.012~0.022 $\mu\text{g/ml}$ 的 Cu^{2+} ，其余各管均未检出。

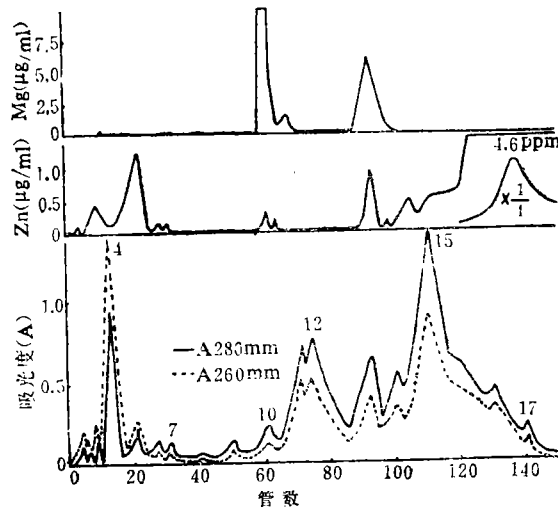


图1 湖南眼镜蛇毒的CMC-52柱色谱图

表1 图1的蛋白洗脱峰馏分中Zn和Mg的浓度(μg/ml)

蛋白峰号	1	2	3	4	5	6	7	9	10
馏分管号	4	6	8	16	21	28	31	50	61
Zn浓度	0.04	0.05	0.22	0.31	1.19	0.11	0.13	0.12	0.19
Mg浓度	0.01	—	0.02	0.08	0.02	0.04	0.05	—	13.3

蛋白峰号	11	12	13	14	15	16	17
馏分管号	71	75	94	101	110	130	137 140
Zn浓度	—	—	0.98	0.09	0.46	2.27	4.63 4.55
Mg浓度	—	—	5.75	0.7	—	—	—

注：表中“—”为浓度低于0.01 $\mu\text{g/ml}$ ；137号管为Zn峰。

2.2 CM-Sephadex C-25柱色谱：CM-Sephadex C-25柱（ $2 \times 50\text{cm}$ ），用pH5.5，0.05mol/L NH_4Ac 缓冲溶液平衡。称取上海毒或湖南毒1g，置于10ml pH5.5，0.05mol/L NH_4Ac 缓冲溶液中放置过夜溶解（10℃左右）或超声处理2h溶解，离心，取上清液上柱。用 NH_4Ac 3个盐直线梯度和pH梯度洗脱。第1梯度为pH5.5，0.05mol/L NH_4Ac 缓冲溶液，第2梯度为pH3.5，0.5mol/L NH_4Ac 缓冲溶液，第3梯度为pH7.0，1.1mol/L NH_4Ac 缓冲溶液。分部收集器收集洗脱液，每管15min，7.5ml/管或8ml/管。洗脱液按上法测定260nm和280nm处的吸收度及Zn、Mg浓度，得洗脱曲线（图2~4所示）。且将分离出的主要蛋白峰馏分中的Zn和Mg浓度列于表2。还用紫外吸收光度法^[16]测得图3的202

表2 图2的蛋白洗脱峰组分中Zn和Mg的浓度($\mu\text{g/ml}$)

蛋白峰号	1	2	3	5	6	7	8	9	10
馏分管号	4	6	11	18	87	97	102	108	125
Zn浓度	0.15	0.10	0.10	0.02	0.04	—	—	0.02	0.03
Mg浓度	—	—	—	—	—	—	—	—	—

蛋白峰号	13	14	15	16	17	19	20		
馏分管号	186	210	224	240	247	285	303	327	342
Zn浓度	—	—	0.08	0.03	—	0.03	—	40.5	44.5
Mg浓度	—	14.4	16.8	—	—	—	0.09		

注：表中“—”为浓度低于 $0.01\mu\text{g/ml}$ ；327和342管为无蛋白的Zn洗脱峰。

号管（峰外）的蛋白质浓度为 1.72mg/ml ，用原子吸收光度法测得其馏分中Zn、Mg、Cu、Ca浓度均小于 $0.01\mu\text{g/ml}$ 。

2.3 脱金属的神经毒蛋白的鉴定和半数致死量(LD_{50})测定：将图3中的202号管馏分上Sephadex G-15柱，去离子水洗脱，收集脱盐的蛋白质成分（经奈氏试剂检验无 NH_4^+ ），得脱盐、脱金属离子的神经毒。用小鸡颈二腹肌实验初步鉴定该组分为神经毒^[17]。将该馏分用紫外吸收光度法^[16]测定蛋白质浓度，用去离子水定量稀释作 LD_{50} 实验。

用60只小鼠，体重 $18\sim 23\text{g}$ ，随机分为6个剂量组，每组10只，腹腔给药 $0.2\text{ml}/10\text{g}$ ，观察24h死亡率为：剂量（ $\mu\text{g/kg}$ ）〔死亡只数/实验只数〕：250〔10/10〕、176.5〔10/10〕、124.6〔6/10〕、87.9〔5/10〕、62.1〔3/10〕和43.8〔0/10〕，经加权机率单位法计算，得到该神经毒素的 LD_{50} 为 0.092mg/kg ，95%可信限为 $0.076\sim 0.110\text{mg/kg}$ 。

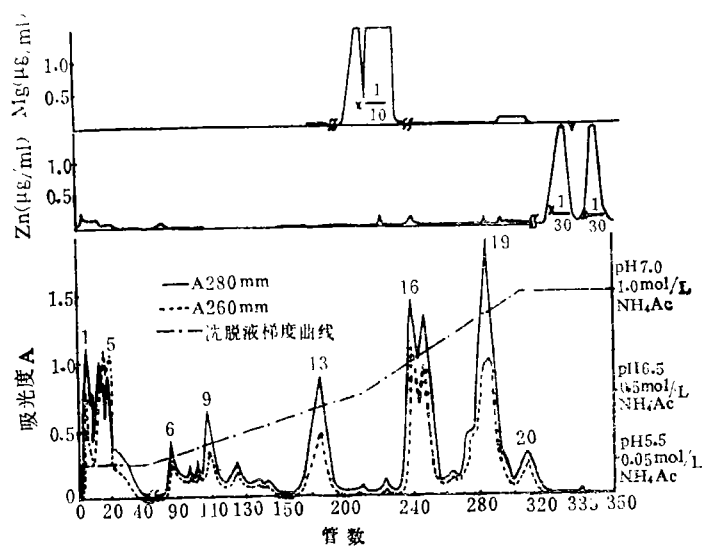


图2 湖南眼镜蛇毒的CM-Sephadex C-25柱色谱图

（样品为放置过夜溶解上柱；洗脱速度： $8\text{ml}/\text{管}$ ， $5\text{min}/\text{管}$ ）

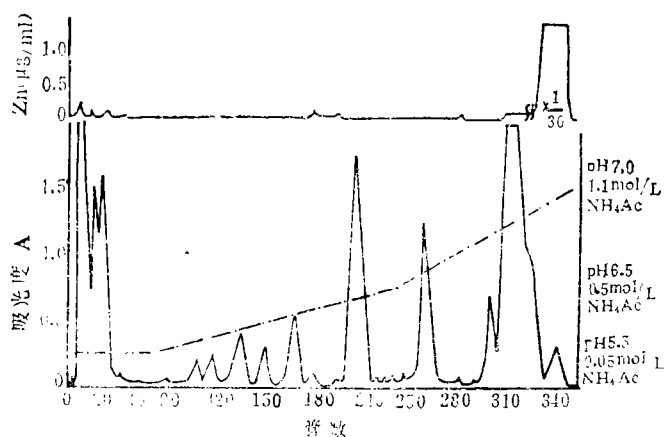


图3 上海眼镜蛇毒的CM-Sephadex C-25柱色谱图

（样品为超声处理溶解上柱；洗脱速度： $7.5\text{ml}/\text{管}$ ， $15\text{min}/\text{管}$ ）

3 讨论

3.1 由于Zn和Mg在该蛇毒中含量很高^[5],且用WFX-110原子吸收光度计能非常灵敏地检测洗脱液中的Zn和Mg,所以选择研究这2种金属元素在柱色谱分离的蛇毒组分中的分布特性。

3.2 从图1~4看出,Zn和Mg随蛇毒蛋白的分离而出现多处洗脱峰,提示 Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 与蛋白组分具有一定的结合。就除去蛋白成分中的Zn和Mg而言,CM-Sephadex C-25柱色谱系统为较好。且以样品

放置溶解上柱比超声处理溶解后上柱更佳。CM-Sephadex C-25柱色谱比CMC-52柱色谱系统使Zn、Mg浓度的降低近平均高约一个数量级(见表1~2)。可见用CM-Sephadex C-25柱色谱分离该蛇毒,可得几乎不含Zn、Mg等的蛋白质组分。

3.3 绝大部分的Mg在色谱图的中部出现。在CMC-52柱色谱系统中(图1),主要的2个Mg峰与2个蛋白质峰几乎重迭,可能为2种含Mg蛋白质所致。在CM-Sephadex C-25柱色谱系统中(图2),主要的2个Mg峰很靠近,仅与2个浓度很低的蛋白质峰重迭。

3.4 大量的Zn主要出现在色谱图的尾部,说明Zn能强烈地保留在这2种阳离子交换柱上,而最后被洗脱。同时,在CM-Sephadex C-25柱色谱系统中,放置溶样上柱作分离,在蛋白质全部流出后,产生2个Zn高峰(图2),而在超声溶样上柱作分离,在蛋白质几乎都流出后,只出现一个Zn高峰,但它与最后一个蛋白峰部分重迭(图3、4),原因有待研究。

3.5 从图1和图2看出,对于吸收度 $A_{280nm} < A_{260nm}$ 的蛋白质的分离,CMC-52柱色谱系统优于CM-Sephadex C-25柱色谱系统,前者可清晰地分出5个蛋白峰,而后者只勉强分出2个蛋白峰。但对于 $A_{280nm} > A_{260nm}$ 的蛋白质的分离,CM-Sephadex C-25柱色谱系统的效果要好得多,且以流速为7.5ml/管,超声处理溶样上柱的情况为更佳。

3.6 从图2~4看出,蛇毒的产地和批次不同,其中某些蛋白质成分的相对含量差别很大。从图3、4中0~80管区域的峰高看,湖南毒和上海毒差别较大,而在250~280管区域,湖南毒比上海毒少了一个很强的蛋白峰,显示出极大的差别。

3.7 对分离出的神经毒中毒性最强的蛋白质成分进行了Zn、Mg、Cu和Ca测定后,表明它的金属元素含量均非常低,但其毒性似乎不受影响,因为我们测得的 LD_{50} 和以往的文献值非常一致^[1,18]。

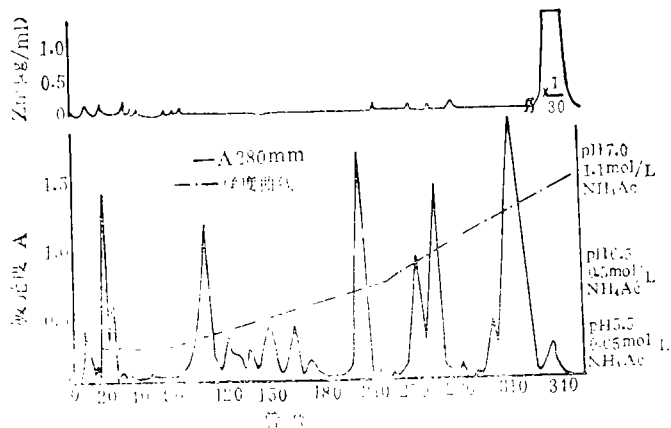


图4 湖南眼镜蛇毒的CM-Sephadex C-25柱色谱图
(条件同图)

参 考 文 献

- 1 江苏新医学院主编,中药大辞典,上海:上海人民出版社,1977, 2107
- 2 陈汝筑,等,中国药理学通报,1988, 4(5), 281
- 3 Hong T N, et al, Toxicol, 1987, 25 (11): 1249
- 4 Ramaswamy R, et al, Indian J EXP Biol, 1988, 26, February, 99

- 5 彭新君. 湖南中医学院学报, 1992, 12(3): 48
- 6 Ray P. J Indian Chem Soc, 1940, 17: 681
- 7 Delezenne C. Ann Inst Pasteur, 1919, 33: 68
- 8 Fleckenstenin, et al. Arch Exper Path U Pharmacol, 1952, 214: 135
- 9 Fleckenstenin, et al. Arch Exper Path U Pharmacol, 1952, 215: 163
- 10 Kaye M A G. Biochem et Biophys Acta, 1955, 18: 456
- 11 Kaye M A G. Congr Intern Biochim, Resumes Commus, 3 Congr, Brussels, 1955, 36
- 12 Achyuthan K E, et al. Biosci, 1983, 5(1): 1
- 13 Klas B. Augustinsson Arkiv Kemi, 1952, 4: 277
- 14 Moav B, et al. Radiochem methods Anal, Proc Symp, Salzburg Austra, 1964, 1: 205
- 15 Khole V, et al. Indian J Biochem Biophys, 1984, 21(6): 409
- 16 中国科学院北京动物研究所. 动物学参考资料, 1975, 4
- 17 徐淑云等. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1982. 595
- 18 陈汝筑, 等. 中国药理学通报, 1988, 4(2): 113

(1993-11-30收稿)

(上接第128页)

讨论

黄柏薄层鉴别中首先将样品酸化或碱化, 再用氯仿萃取均比直接萃取效果好。

进行含量测定时, 使用多种有机溶剂均不能将盐酸小檗碱萃取完全, 故采用全量蒸干后上柱处理, 洗脱剂选用无水乙醇。如用95%乙醇洗脱(中国药典. 一部. 1990. 474), 杂质洗脱下来的要多, 进行薄层扫描时, 色谱背景有些干扰。用无水乙醇40ml洗脱后继续洗脱, 所收集的洗脱液中未检出盐酸小檗碱斑点。

盐酸小檗碱的含量测定方法已有不少报道, 由于本品为液体制剂且盐酸小檗碱含量较低, 其他成分干扰大, 柱层-紫外分光光度法, 计算紫外分光光度法等均不适用。将样品蒸至近干用氯仿-盐酸(100:1)回流提取〔李同芬. 中国中药杂志, 1989, 14(6): 33〕, 制备供试品溶液, 薄层扫描测定结果偏低。经过反复试验摸索, 采用了柱层分离后, 再用薄层扫描法测定。文中所述定性和定量方法简便易行, 结果可靠, 专属性强, 重现性好, 可用于监测产品的内在质量。

(1993-10-11收稿)

表 复方黄柏液中盐酸小檗碱含量

批 号	含量 (mg/100ml)		平均值
910701	0.216	0.227	0.222
910801	0.261	0.257	0.259
910901	0.229	0.217	0.223
901302	0.170	0.179	0.174
910805	0.154	0.148	0.151
910906	0.192	0.192	0.192
920101	0.174	0.181	0.178
920603	0.173	0.169	0.171
920704	0.193	0.188	0.190
920905	0.153	0.153	0.153