

两种取毒方法所得蝎毒的比较

宋文霞 王锦兰

(中国科学院生物物理研究所,北京)

作为中药全蝎的主要有效部分的蝎毒具有多种生理和生化功能,所以,对蝎毒的研究在理论上和应用上都是很有意义的。

蝎毒的采集一般采用电刺激法。王锦兰等已经对用此法所采集的马氏钳蝎 (*Buthus martensii kashi*) 蝎毒进行了分离提纯,并且测定了其生物化学性质^[1]。我们试用了剪尾法取毒,并对两种方法所取的蝎毒进行了比较。

材料与 方法

四月下旬在山东省益都县采集活蝎,就地剪下尾节,浸于生理盐水中,0℃ 保存。将尾节研磨后,用蒸馏水抽提可溶性成份,离心 5000 转/分,5 分钟;重复三次,将上清液真空冷冻干燥,得到黄色蝎毒粗毒干粉,-20℃ 保存。

蝎毒毒素的分离、提纯以及毒性、等电点、分子量和肽链 N-末端的测定方法同文献[1]。

结果与 讨论

蝎毒粗毒经 Sephadex G50 柱层析分离也得到六个部分,其中峰 III 具有毒性;这一毒性部分经 Sp-Sephadex C25 柱层析纯化得到五个

表 1 马氏钳蝎粗毒经 Sephadex G50 柱层析分离各组分的内容和毒性

分离组分(峰)	毒性	百分含量(%)	
		剪尾粗毒	电刺激粗毒 ^[1]
I	—	45.7	77.4
II	—	13.5	6.1
III	+	18.7	8.5
IV	—	13.1	3.2
V	—	3.4	2.7
VI	—	5.6	2.1

部分(盐梯度洗脱后),其中峰 B、C、E 为毒性部分。和电刺激法所取蝎毒相比,两步分离的层析图谱都略有变化,有效成份收率大大提高(表 1、表 2)。

表 2 峰 III 经 Sp-Sephadex C25 柱层析分离各组分的内容和毒性

分离组分(峰)	毒性	百分含量(%)	
		剪尾蝎毒	电刺激蝎毒 ^[1]
盐梯度前	—	44.9	
A	—	6.3	4.5
B	+	6.0	5.1
C	+	9.4	6.1
D	—	1.7	
E	+	10.0	8.3

蝎毒经分离提纯,毒性提高约 12 倍。剪尾法所得粗毒毒性较高,是电刺激法所取粗毒的 2.6 倍,但纯化后,剪尾法所得蝎毒毒素多肽的毒性比电刺激法的略偏低(表 3)。

表 3 马氏钳蝎蝎毒的毒性

蝎毒样品	半致死剂量 (r/g 体重)		毒性提高倍数	
	剪尾蝎毒	电刺激蝎毒 ^[1]	剪尾蝎毒	电刺激蝎毒 ^[1]
粗毒	13.6	36.0	1.0	1.0
Sephadex G50 柱层析峰 III	2.9	1.2	4.7	30.0
Sp-Sephadex C25 柱层析峰 E	1.1	0.34	12.1	106.0

峰 B、C、E 经等电聚焦测定均呈一条带,经测定均呈现单一的 N-末端,说明它们是均一的。其等电点分别是 8.6、8.9、8.9,分子量分别为 5,860、5,460、5,050, N-末端均为缬氨酸,这

(下转第 49 页)

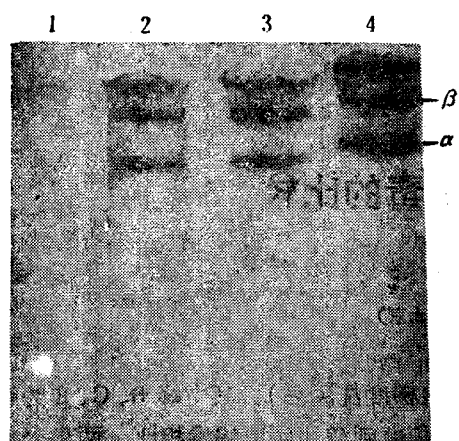


图1 提纯的I型胶原聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳

1. 加入胶原酶反应管。
 2. 加入胰蛋白酶反应管。
 3. 经24小时保温空白胶原管。
 4. 未经保温的空白胶原管。
- α : I型胶原单聚体。
 β : I型胶原二聚体。

(甲醇: HAc: 水为5:1:4)染色3小时后,用含7.5% HAc和5%甲醇溶液脱色。电泳结果见图1。

讨 论

I型胶原广泛存在于真皮,肌腱,骨及齿等组织中,而以真皮中含量最高。未经共价交联的原胶原为可溶性胶原,它的提取与纯化,是检测在生理及病理情况下胶原代谢过程中有关酶活性的重要依据。如上所述,本文提取的I型胶原经圆盘电泳证实,其纯度较高,仅可见到 α 带(单聚体)及 β 带(二聚体),不混入其它杂区带,与国外有关文献报道的结果一致^[9]。经25℃、24小时保温后,仍能保持其特异性区带。胶原酶在中性条件下作用于原胶原分子,使其在离氨基端3/4处断裂成为两部分,然后在32℃以

(上接第50页)

和电刺激所取蝎毒的测定结果基本相似。

由此可见,两种方法所采集的蝎毒的主要有毒成份和毒素多肽的生化性质基本相同^[1],但两者的分离层析图谱,有效成分收率和毒性又存在着一定的差异。剪尾法所取的是蝎子毒腺中所储存的全部毒液,而电刺激法所取的是释放出的部分毒液,存在的差异可能是由于两

上条件下自动变性,丧失其螺旋构型。本实验证明,所提取的I型胶原单聚体,二聚体均可被细菌性胶原酶完全降解, α 、 β 带消失;而胰蛋白酶对该胶原无降解作用。

采用本实验方法从家兔皮肤中提取I型胶原,得率较高,250克湿重皮肤大约可提纯1克。

实验周期较长,约历时1个月,在此过程中始终保持4℃条件,是提取成功的重要保证,否则将会因温度过高而使提取物变性。在盐析过程中,应尽量避免加入固体盐,以防局部液体浓度过高而影响提取。改进的方法是先配制一定高浓度的盐溶液(预冷),然后在搅拌下缓慢加入。在纯化I型胶原之前,将提取液对pH 7.3的0.1M Tris缓冲液透析,直至平衡后的pH达7.3,这是必须的,不可用NaOH直接调pH,否则会降低得率。

聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳,由于本实验所用的缓冲系统是酸性的,在室温低于15℃的情况下,分离胶往往不能自动聚合,需在20℃以上的条件下进行。这在实验过程中也是应该加以注意的。

参 考 文 献

- [1] Gerlach, U., Pott, G. et al.: *Connective tissue of the normal and fibrotic human liver*, Georg Thieme, Stuttgart. New York, 1982.
- [2] Glimcher, M. J., Francois, C. J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 93: 585, 1964.
- [3] Timpl, R., Glanville, R. W. et al.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 356: 1783, 1975.
- [4] Nagai, Y., Gross, J. et al.: *Ann. NY Acad. Sci.*, 121: 494, 1964.
- [5] Maruyama, K., Feinman, L. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 658: 124, 1981.

[本文于1986年1月20日收到]

者在组成成份、成份比例以及有毒组分分子结构等方面有一定差异。

与电刺激法相比,剪尾法简便、快速、收率高,适于大量采集蝎毒,缺点是活蝎只能供一次性采集。

参 考 文 献

- [1] 王锦兰等:《生物化学杂志》,1(3), 29—37, 1985.

[本文于1986年4月21日收到]