

麻疯树毒素的分离及其某些性质

黄德如 黄东宏 郭似旋* 潘克桢

(中国科学院福建物质结构研究所,福州 350002)

黄自强 林建中

(福建医学院药理教研室)

提 要

用磷酸盐缓冲液萃取,硫酸铵盐析及葡聚糖凝胶 G-100 柱层析后,从麻疯树种子分离出三个蛋白组分。其表观分子量分别约为 34000、27000 和 9500 道尔顿;等电点分别为 8.1、8.8 和 8.8。它们在紫外区呈现典型的蛋白吸收光谱。组分 I 毒性最大,小鼠腹腔注射半致死量 (LD_{50}) 为 6.39mg。

关键词 麻疯树毒素,分离,性质

植物毒蛋白通常指从植物体分离得到的对真核细胞核糖体的蛋白合成有强烈抑制作用的蛋白。它们广泛而诱人的药用前景,正日益引发人们的研究兴趣^[1,2]。麻疯树 (*Jatropha curcas*) 种子中含有属单链植物蛋白^[2]的麻疯树毒素 (curcin)。Stirpe 等曾对麻疯树毒素的分离及其毒性作了初步的研究^[3],表明它和巴豆毒素有着类似的毒性和抑制蛋白质合成的作用。

本文叙述了对厦门麻疯树种子中的毒蛋白的分离纯化过程及有关性质研究。

材 料 和 方 法

麻疯树种子由福建亚热带植物研究所张永田同志提供。血凝试验红血球由福建医学院生化教研室提供。毒性实验动物昆明系小鼠由福建医学院动物中心供应。葡聚糖凝胶为 Sigma 公司的 Sephadex G-100,分子量标准蛋白质牛血清白蛋白 (68kD)、卵白蛋白 (43kD)、溶菌酶 (14.3kD) 为 Sigma 公司产品,精制天花粉蛋白 (25.5kD) 则由中科院上海有机化学研究所制备。等电聚焦电泳标准蛋白为 Sigma 公司产品,两性电解质 (pH3.5—10) 为上海生化所东风试剂厂生产。其他药品均为进口分装或

国产分析纯试剂。核酸蛋白检测仪 HD-88-7A,上海兴华电子仪器厂产品。

1. 麻疯树毒素的分离纯化 麻疯树籽种仁 100g 加 PBS 0.005mol/L (磷酸盐缓冲液,含 0.2mol/L NaCl, pH 7.2) 800ml,经破碎和匀浆处理,并用电磁搅拌器搅拌 4h,于 4℃ 静置过夜。匀浆液以 12000r/min 离心 15min,小心地刮去上层油膜,清液过滤除去残油,弃掉离心管底部残渣。在清液中加入固体硫酸铵并不断搅拌,直至溶液中硫酸铵饱和度达 95%,静置 4h 后,以 16000r/min 离心 10min 收集沉淀,并溶于尽量少的 PBS 缓冲液,然后对流动的同—缓冲液透析 48h。把透析中出现的灰色沉淀物离心除去,所得溶液即为粗毒液。将粗毒液 12ml 在用 PBS 平衡好的 Sephadex G-100 柱层析,并以同一缓冲液洗脱 (凝胶柱尺寸为 2.6×80 cm),洗脱速度为每小时 24ml,每管收集 4ml,用核酸蛋白检测仪的 A_{280} 检测。

2. 分子量的测定 按文献 [4] 进行连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,凝胶浓度为 10%。含 1% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 和 1% 巯基乙醇的蛋白溶液经 100℃ 水浴中加热 3min 后电

* 现在福州大学实验中心。

泳,考马斯亮蓝染色,与分子量标准蛋白质比较,估计蛋白质的分子量。

3. 光谱测定在岛津 UV-3000 分光光度计上进行。

4. 等电点的测定 按文献[5]进行。

5. 血凝试验参考文献[6]进行。

6. 用 Kärber's 法测定小白鼠腹腔注射毒素组分的 LD₅₀ 和 95% 可信限。

结果和讨论

1. 蛋白质的分离和纯化:

麻疯树种子核仁含油量较高,匀浆液经离心后,上面出现一层较厚的油膜,小心地刮去油层,清液经过滤除去残油,除油效果良好,与文献[3]的方法相比较,省去了用乙醚反复萃取除油的处理过程,避免了乙醚处理可能引起的蛋白变性。粗毒加到 Sephadex G-100 柱并经 PBS 洗脱后得到三个峰,依次为蛋白组分 I、II、III (如图 1)。分离结果表明厦门麻疯树种子所含的蛋白质组分以毒性最高的蛋白组分 I 为主。

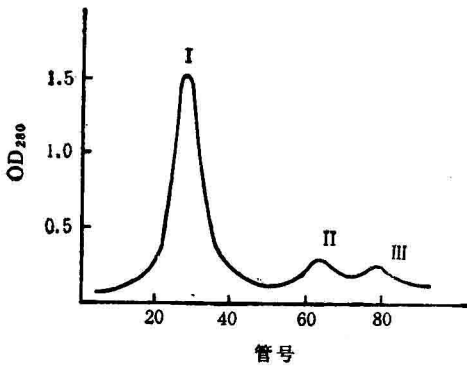


图1 Sephadex G-100 柱层析分离麻疯树毒素

从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图(图2),可以看到蛋白组分 II 和 III 的电泳结果为单一区带,表明它们已达到均一程度,而组分 I 的主带上部尚有二条模糊的弱带,说明组分 I 中可能含有少许杂蛋白成分。试图用 Sepharose-4B 柱进一步纯化组分 I,但效果不佳。蛋白组分 I 经 Sephadex G-150 柱(柱尺寸为 2.6 × 60cm)进一步分离后可分出两个峰(如图3)。在这两个峰中,前者含量较少,为杂蛋白;后者为毒性

组分。这一过程显然也未能将杂蛋白组分全部除去,但是经 Sephadex G-150 柱进一步处理后,蛋白组分 I 得到进一步纯化,已可培养出晶体(另文讨论)。

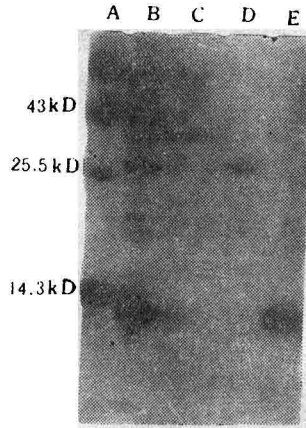


图2 麻疯树毒素组分的 SDS-电泳图谱

A. 标准分子量蛋白。B. 粗毒。C. D. E. 对应毒素组分 I,II,III。

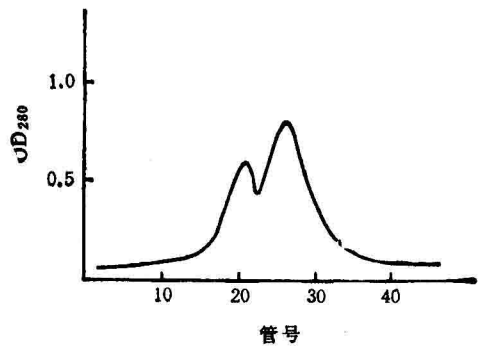


图3 Sephadex G-150 柱层析纯化麻疯树毒素组分 I

2. 蛋白质的分子量 以 SDS-凝胶电泳法测得蛋白组分 I、II 和 III 的分子量分别大约为 34000、27500 和 9500 道尔顿。用 Sephadex G-75 凝胶过滤法进行蛋白分子量测定以作对照。结果表明两种方法所测得组分 II 和组分 III 的分子量基本相符。而凝胶过滤法所测得的组分 I 的分子量比用 SDS-凝胶电泳法略大。这除了组分 I 所含少量杂蛋白产生干扰之外,可能与组分 I 的蛋白分子与规则球形分子有较大的偏差有关。

3. 血凝试验: 结果表明麻疯树粗毒及分离所得各组分对人血红细胞均无凝集作用。

4. 光谱测定 表明蛋白组分 I、II、III 均在紫外区的 280nm 附近出现典型的蛋白吸收峰, 峰值分别为 278、272 和 275nm。

5. 等电点 三个蛋白组分在等电聚焦电泳中均只出现一条蛋白区带, pH 值依次为 8.1、8.8 和 8.8。

6. 动物急性中毒试验 结果见表 1。小鼠中毒死前症状包括行为共济失调, 拉稀便, 耳血管暂时扩张, 活动和食量明显减少, 尸体解剖见心脏停止于收缩期, 肺, 肝和静脉淤血。大多数中毒鼠的死亡见于给药后 8—24h, 少数死于 24—48h 间。从表 1 可见, 组分 I 的毒性试验结果与文献[3]报道相近。而从厦门麻疯树种子提取的粗毒的毒性比文献[3]的报道值大。这

表 1 麻疯树粗毒及毒素组分 I 对小鼠腹腔注射的急性 LD₅₀

毒 素	组 数	只/组 ¹⁾	LD ₅₀		
			mg/只	(mg/10g)	95% 可信限
粗 毒	5	10	6.76	(2.71)	6.05—7.56
毒 素 I	5	10	6.39	(2.55)	5.87—6.94

1) 按只计算时, 每只小鼠以 25g 计。

与厦门麻疯树种子毒素组分 I 的含量较高的结果相符。小鼠腹腔注射组分 II 超过 6mg/只仍未出现中毒现象, 这一结果与文献[3]的报道相似。因组分 III 含量少, 难以收集到足以供进行中毒实验的量。

中科院福建物质结构研究所陈明晃, 郭卫东和叶晓明对本文工作给予诸多协助和支持, 谨此致谢。

参 考 文 献

- 1 郑硕. 生物化学与生物物理进展, 1987; (4): 19
- 2 郑硕. 生物化学与生物物理进展, 1989; 16(1): 16
- 3 Stirpe F et al. *Biochem J*, 1976; 156: 1
- 4 Weber K, Osborn M. *J Biol Chem*, 1969; 244: 4406
- 5 蔡武城等编. 生物化学实验技术教程. 上海: 复旦大学出版社, 1983; 19—21
- 6 苗积生, 吴吉勇, 沈毅等生物化学与生物物理进展, 1987; (4): 59

[本文于 1990 年 2 月 8 日收到, 1990 年 7 月 3 日修回]

(上接第 136 页)

- 8 Hasegawa Y, Kunihara M, Maruyama Y. *J Chromatogr*, 1982; 239: 335
- 9 Beilharz G R, Middlehurst C R et al. *Anal Biochem*, 1984; 137: 324
- 10 Yu Bi, Zeng Xianying, Weigelt H. *Int J Microcirc: Clin Exp*, 1986; 5(1): 107
- 11 Yu Bi, Chinese patent 87014761, 1987
- 12 Yu Bi. *Chinese J Physiological Science*, 1989; 5(1): 10
- 13 Yu Bi, Zhang Yiqun, Hong Wenbin. *Biosensors & Bioelectronics*, 1990; 5: 215
- 14 Jope R S, Jenden D J, Ehrlich B E et al. *N Engl J Med*, 1978; 299: 833

- 15 Ehrlich B E, Diamond J M. *J Membrane Biol*, 1980; 52: 187
- 16 Lingsch C, Martin K. *Br J Pharmacol*, 1976; 57: 323
- 17 Jope R S. *J Neurochem*, 1979; 33: 487
- 18 Ehrlich B E, Diamond J M. *Am J Physiol*, 1979; 237 (1): C102
- 19 Bogdan E C, Beilharz G R, York M J et al. *Biochemical and biophysical research communications*, 1972; 105 (4): 1280
- 20 Michelson M J, Zeimal E V. In: Alexander P, Bacq Z M eds, *International series of monographs in pure and applied biology*, V 38, New York, 1973: 28

[本文于 1990 年 2 月 13 日收到, 6 月 4 日修回]