

## 技术与方法

# 中国江西蝮蛇蛇毒中舒缓激肽增强肽的分离纯化

魏 珊 任永忠

(中国医科大学生化教研室, 沈阳)

### 提 要

应用乙醇提取, 经柱层析及纸层析等方法, 从中国江西蝮蛇毒中分离纯化获得三个 BPP 组分, 为九肽, 十肽和十六肽。在离体豚鼠回肠都有增强舒缓激肽的作用, 其肽链脯氨酸含量都很高。结构特点与日本及中国浙江蝮蛇毒 BPP 极为相似。

蛇毒中舒缓激肽增强肽 (Bradykinin potentiating peptide 简称 BPP) 是含五—十三个氨基酸残基的活性短肽。有很多文献报道<sup>[1-4]</sup>。BPP对血管紧张素 I 转化酶有很强的抑制作用, BPP 既能抑制激肽酶 II, 增加舒缓激肽的作用, 还能抑制血管紧张素 I 转化酶, 使体内不致产生有加压作用的血管紧张素 II, 是一种有效的降压物质。目前已人工合成了一种更简单有效的 BPP 类似物—甲硫丙脯酸 (2-甲基-3-巯基丙酰脯氨酸)<sup>[5]</sup>, 广泛应用于临床治疗肾性高血压。

本文报道了用比较简单有效的方法, 从中国产江西蝮蛇 (*Agkistrodon blomhoffii brevicaudus stejneger*) 蛇毒中分离提纯了三个 BPP 组分, 分别测定了氨基酸组成。

### 材 料 与 方 法

江西蝮蛇毒冷冻干粉系中国医科大学副研究员郝文学惠赠。

舒缓激肽(BK)系美国 Sigma 公司产品。

各种型号的 Sephadex 及 SP-Sephadex C-25 均为瑞典 Pharmacia 公司产品。

舒缓激肽及 BPP 的生物活力测定参照何子安方法<sup>[6]</sup>。

纸层析氯气显色方法 层析滤纸 30℃ 恒温箱中展层 6 小时, 展开剂为正丁醇-醋酸-水 (3:1:1)。展开完毕后, 吹干滤纸上残存的展开剂, 将滤纸悬于氯气缸中, 10 分钟后取出, 用淀粉碘化钾试剂显色。

氨基酸组分分析 剪下 BPP 层析点装入试管内, 用甲醇液浸提 12 小时, 蒸发除去甲醇, 用 1ml 5.7mol/L 的盐酸溶解, 充氮气密封, 在 105—110℃ 下水解 24 小时, 在 835 型日立氨基酸自动分析仪上测定。测定结果可根据 Kato<sup>[7]</sup> 的计算方法, 求出各种氨基酸的克分子数。

### 实 验 结 果

#### 1. 用乙醇粗提蛇毒

取蛇毒冷冻干粉 10 克, 溶于 1000ml 蒸馏水中, 在沸水浴中煮沸 10 分钟, 冷却后加 95% 乙醇(500ml/克粗毒), 将乙醇混悬液过滤, 上清液在旋转蒸发器上浓缩至干。将减压抽干的粉末再用无水乙醇提取三次, 每次 20ml, 合并提取液浓缩至干。

#### 2. 用柱层析分离提取 BPP

将上述乙醇提取得到的干粉溶于 2ml 0.02mol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  缓冲液中, 直接加到

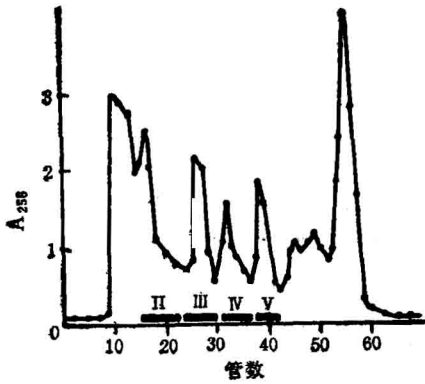


图1 乙醇提取液在 Sephadex G-15 柱上的分离  
II III IV V 为活力组分。洗脱流速 30ml/hr 每  
6min 接收一管

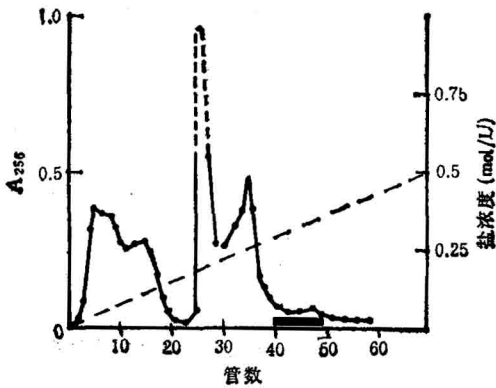


图2 BPP 在 SP-Sephadex C-25 柱上的分离  
40—49 管为活力组分。洗脱流速 30ml/hr, 每 6min  
接收一管。

A、B、C,  $R_f$  值分别为 0.49, 0.44, 0.35。氯气显色一条带, 与茚三酮显色的 B 带重合。经生物鉴定, 在离体豚鼠回肠中, A、B、C 三个组分都能增加舒缓激肽的收缩作用, 见图 6。分别称 P-A、P-B 和 P-C。经氨基酸组成分析, P-A 为九肽, P-B 为十肽, P-C 为十六肽(详见表 1)。

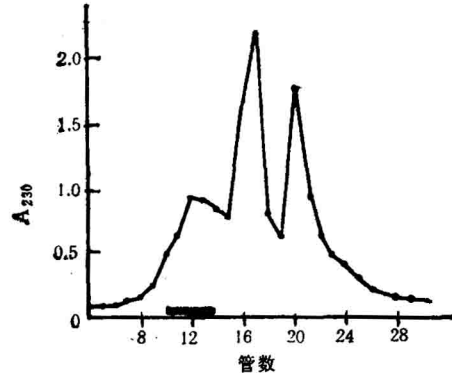


图3 BPP 在 Sephadex G-10 柱上的分离  
12—14 管为活力组分。洗脱流速 3ml/18min,  
每 18min 接收一管。

Sephadex G-15 层析柱 (1.7 × 170cm) 中, 用 0.02mol/L pH8.0  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  缓冲液平衡洗脱, 见图 1。将活力峰合并收集, 用蒸馏水稀释一倍, 并用甲酸调 pH 至 2.5 左右, 在 SP-Sephadex C-25 层析柱 (11 × 30cm) 上分离, 用 0.01mol/L pH2.5 甲酸铵和 0.5mol/L pH6.2 甲酸铵梯度洗脱(各 100ml), 层析图谱见图 2。峰活力部分合并浓缩, 加到 Sephadex G-10 柱 (1.0 × 110cm) 上脱盐, 用 0.1mol/L, pH 1 的盐酸平衡洗脱, 见图 3。收集活力峰用奈氏试剂检查确定其不含  $\text{NH}_4^+$ , 浓缩以备纸层析分离用。

### 3. BPP 提取物在纸层析上分离

除盐浓缩后的活力部分在新华滤纸上层析提纯。结果见图 4、图 5。茚三酮显色三条带

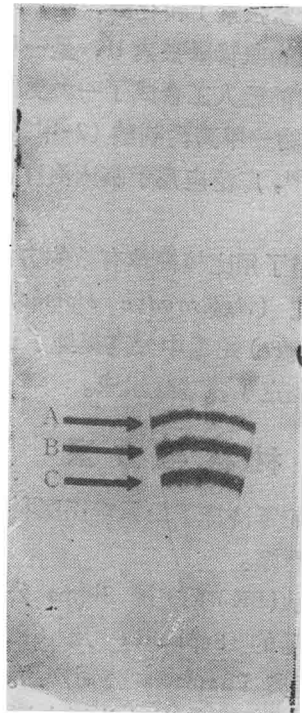


图4 BPP 纸层析分离图谱(茚三酮显色)

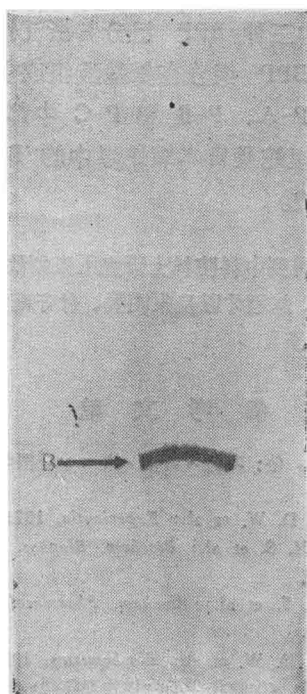


图5 BPP 纸层析分离图谱(氨气显色)

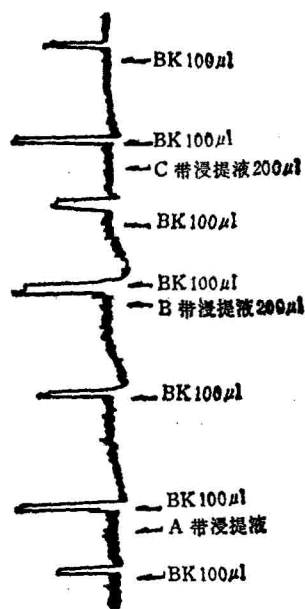


图6 纸层析分离后各组生物鉴定

A 带浸提液 40 $\mu$ g/ml  
 B 带浸提液 50 $\mu$ g/ml  
 C 带浸提液 40 $\mu$ g/ml

## 讨 论

1965年 Ferreira<sup>[8]</sup> 首先在美洲茅头蝮蛇 (*Bothrops Jararaca*) 毒中发现了能在体内外

增加舒缓激肽作用的 BPP 因子, 并先后阐明了九种 BPP 因子的结构<sup>[9,10]</sup>。其后不久, Kato<sup>[7,11,12]</sup> 等也从日本蝮蛇亚种 (*Agkistrodon*

表1 中国江西蝮蛇浙江蝮蛇及日本蝮蛇毒中各种 BPP 的氨基酸组成

氨基酸	中国江西蝮蛇			中 国 浙 江 蝮 蛇	日 本 蝮 蛇				
	P-A	P-B	P-C		A	B	C	D	E
Lys			0.9(1)			1			1
Arg	0.9(1)	0.6(1)	1.5(2)	0.9(1)	1	1		1	
Glu	1.0	1.0	1.0	1.1(1)	1	1	1	1	1
Pro	3.3(4)	2.6(3)	5.6(6)	6.0	5	5	6	6	5
Gly	1.2(1)	1.4(1)	1.9(2)	1.9(2)	2	1	2	1	
Ile	0.9(1)	0.9(1)	1.4(1)	0.9(1)	1	1	1	1	
Leu						1	1	1	
Asp		0.9(1)	1.1(1)						1
Ser		0.6(1)							1
Val									1
Trp									1
His	0.8(1)	0.8(1)	1.9(2)						
总数	9	10	16	11	10	11	11	11	11

*halys blomhoffii*) 中分离得到了五种 BPP 组分,并测定了结构。在我国,1981年上海生化所何子安<sup>[6]</sup>等从中国浙江蝮蛇亚种 (*Agkistrodon halys pallas*) 中提纯了一种 BPP 组分,并阐明了其结构。在其他蛇种已知结构的 BPP 中,最大的为十三肽,最小的为五肽,多数在十肽左右,其结构特点是: N 末端都是环谷氨酸, C 末端都是脯氨酸,肽链中脯氨酸含量很高,且往往成双出现。我们从江西蝮蛇毒中提纯得到三个 BPP 组分, P-A、P-B 和 P-C, P-A 为九肽, P-B 为十肽, P-C 为十六肽。从表 1 中可看到, P-A 含四个脯氨酸, P-B 含三个脯氨酸, P-C 含六个脯氨酸,这三个肽链中都含一个谷氨酸。江西蝮蛇毒中 BPP 的氨基酸组成与其他蛇种中 BPP 的组成虽有不同,但脯氨酸含量高,这点是相同的。已有人证明<sup>[13]</sup> BPP 的活性与 C 端脯氨酸二肽有关。BPP 能抑制激肽酶 II 和血管紧张素 I 转化酶(现在认为二者为同一酶)的活性。舒缓激肽是含两个脯氨酸的九肽,血管紧张素 I 是含一个脯氨酸的十一肽, BPP 的结构与两者相类似。BPP 是否通过与舒缓激肽的作用,抑制血管紧张素 I 的转化,这是一个非常有意义的题目。从表 1 中可发现,

江西蝮蛇毒中三种 BPP 组分与浙江蝮蛇及日本蝮蛇毒中 BPP 组分在氨基酸组成上明显的不同之处是 P-A、P-B 和 P-C 中都含组氨酸,而浙江蝮蛇及日本蝮蛇毒中的 BPP 组分都不含组氨酸。

本实验曾得到中科院林土研究所张剑秋,中国医科大学郝文学,赵迺才以及朱明晏、付守庭等的帮助,在此一并致谢。

### 参 考 文 献

- [1] 青木延雄,他:凝固·纤溶·キニン,医学社,日本,1984。
- [2] Cushman, D. W. et al.: *Experientia*, 1973, 29, 1032.
- [3] Cheung, H. S. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1973, 293, 451.
- [4] John, M. S. et al.: *Biochem. Pharmacology*, 1971, 20, 1557.
- [5] Cushman, D. W. et al.: *Biochemistry*, 1970, 9, 2583.
- [6] 何子安等:《生物化学与生物物理学报》,1981,5,451.
- [7] Kato, H. et al.: *Biochemistry*, 1971, 10, 973.
- [8] Ferreira, S. H. et al.: *J. Pharmacol.*, 1965, 24, 163.
- [9] Ferreira, S. H. et al.: *Biochemistry*, 1970, 9, 2583.
- [10] Ondetti, M. A. et al.: *Biochemistry*, 1971, 10, 4033.
- [11] Kato, H. et al.: *Experientia*, 1969, 25, 694.
- [12] Kato, H. et al.: *Experientia*, 1970, 26, 1205.
- [13] Kato, H. et al.: *Experientia*, 1973, 29, 574.

[本文于 1987 年 5 月 30 日收到]

(上接第 126 页)

3.27%。

通过对红细胞 SOD 比活性的测定及其影响因素的探讨,我们建立了一种微量、快速、灵敏、重复性良好的红细胞 SOD 比活性测定方法。适应于儿童及小动物采样,有利于普通生化实验室大批量常规测试工作,可广泛推广应用。

本工作曾得到河南省肿瘤研究所刘增印副研究员的热情帮助,特此致谢。

### 参 考 文 献

- [1] McCord, J. M. and Fridovich, I.: *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 6049.
- [2] Oberley, L. W. et al.: *Cancer Research*, 1979, 39, 1141.

- [3] Marklund, S. L. et al.: *Cancer Research*, 1982, 42, 1955.
- [4] 王赞舜等:《中华老年医学杂志》,1985,4(4)。
- [5] 王灏:《南通医学院学报》,1983,4(2)。
- [6] Marklund, S.: *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 7504.
- [7] Joenge, H. Scand.: *J. Clin. Lab. Invest.*, 1979, 39, 759.
- [8] Sun, M. and Zigman, S.: *Anal. Biochem.*, 1978, 90, 81.
- [9] Tyler, D. D.: *Biochem. J.*, 1975, 147, 493.
- [10] 李益新等:《生物化学与生物物理进展》,1983,(2), 59.
- [11] Misra, H. P. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, 3170.
- [12] Miller, G. C.: *Anal. Chem.*, 1958, 31, 964.
- [13] Hawley, M. D. et al.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 1967, 89, 447.

[本文于 1987 年 4 月 7 日收到]