

· 研究简报 ·

平颞海蛇蛇毒组份的研究

曾家荣 吴世海 庞福雄 莫有群 许禄远

(广西海洋研究所)

苏拔贤* 程明哲 卓肇文 劳子谦

(中山大学生物学系)

平颞海蛇 (*Lapemis hardwickii*) 与青环海蛇 (*Hydrophis cyanocinctus*) 广泛分布于太平洋、印度洋的一些海域。我国广东、广西、福建、台湾沿海较常见, 是我国北部湾产量较多、毒性较大的两种主要海蛇。

平颞海蛇属海蛇科 (*Hydrophiidae*)。其毒液含有毒素、酶类及多糖等物质, 是供分子生物学研究及临床使用的极贵重药剂⁽¹⁾。

A·T·Tu 等人⁽²⁾曾用提取毒腺方法, 从泰国海湾平颞海蛇取得蛇毒并对神经毒蛋白进行了研究, 尚未见有酶活性分布报导。我们在1983年研究青环海蛇蛇毒组份的基础上⁽³⁾, 继续对北部湾二种主要海蛇之一的平颞海蛇蛇毒进行了基本组份的研究。

1. 材料与方法

(1) 蛇毒及取毒方法 平颞海蛇取自广西北海市及广东三亚等地沿海, 以咬皿法取得毒液后, 立即冷冻干燥成白色海绵状固体。溶解于水为无色透明胶状液体。

(2) 试剂 葡聚糖凝胶G-75及CM葡聚糖凝胶C-50均系 Pharmacia 产品, 用前均经过充分处理及脱气。其余试剂为分析纯或生化试剂。

(3) 测定方法

① 各种酶活性及毒性半数致死剂量的测定方法参照文献[3]。

② 蛋白质含量测定⁽⁴⁾。将蛇毒样品液稀释为0.1—1.0毫克蛋白质/毫升浓度, 在280nm下测定光密度, 所得数值查对蛋白质标准曲线, 然后根据稀释倍数求出原样品液蛋白质含量。

③ 电泳分析方法。pH4.3, 聚丙烯酰胺凝胶浓度为15%的连续系统的圆盘电泳。

本文1985年9月收到

• 执笔人

电极缓冲液为0.9N醋酸，电泳时间约2小时，电压50伏，电流为2毫安/管。电泳完毕以10%三氯醋酸固定，再以考马斯亮蓝R₂₅₀染色。

2. 结果与讨论

(1) 柱层析分离 平颞海蛇蛇毒冻干品用少量重蒸水溶解后进行柱层析⁽³⁾。整个柱层析过程均在10°C以下进行。

① Sephadex G-75柱层析分离提取共得4个蛋白峰(图1)，毒力分布如表1。实验结果表明L.GⅣ是主要毒性峰，共收得蛋白质296毫克，占总量40%。

② 第一次CM-Sephadex C-50柱层析分离得4个蛋白峰(见图2)，洗脱峰的毒力分布如表2。

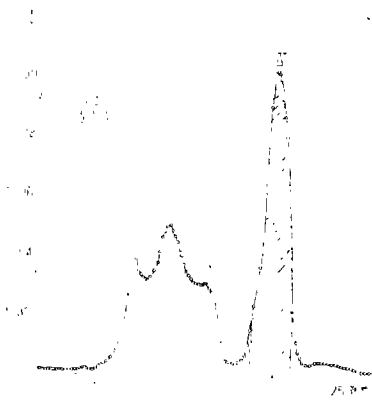


图1 平颞海蛇粗毒Sephadex G-75柱层析分离图

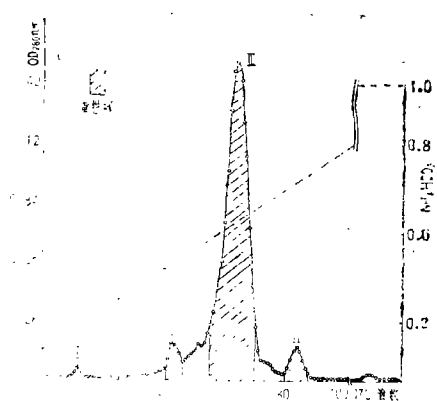


图2 平颞G.Ⅳ组份的CM-Sephadex C-50柱层析分离图

表1 Sephadex G-75柱层析各洗脱组份的毒力分布

峰号 (L.G)		I	II	III	IV
毒力试验*	0.5	全活	全活	全活	全死
(微克/克体重)	0.1				全死

*毒力试验每组用小白鼠3个

表2 一次CM-Sephadex C-50柱层析各洗脱组份毒力分布
(毒力单位为微克/克体重)

峰号 (L.G·Ⅳ-C)		I	II	III	IV
毒力试验	0.5	全活	全死	全死	全死
	0.25		全死	全死	全死
	0.1		全活	全死	全死
	0.075			2/3死亡	1/2死亡

分离结果及毒力分布情况表明,图2中第Ⅲ峰是主要毒性峰,其收集液经冻干后共得蛋白质163.7毫克,占总量68%。

③ 第二次CM-Sephadex C-50柱层析分离共得2个蛋白峰(图3),毒力分布如表3。

表3 二次CM-Sephadex C-50柱层析毒力分布

毒力试验(微克/克体重)	0.1	0.075	0.05	0.03
峰号(L.G.V-C.Ⅲ-C)	I	1/3死亡	全活	全活
	Ⅱ	全死	全死	2/3死亡

表3及图3表明,毒性主要分布于峰Ⅱ(简称为L.G.V-C.Ⅲ-C.Ⅱ)。峰Ⅱ直接冻干后共得蛋白质68毫克,占上柱总量45.3%。

(2) 毒性主要组份纯度及LD₅₀值测定

① 纯度测定: 1) 柱层析试验: 将已分离的毒性组份L.G.V-C.Ⅲ-C.Ⅱ第三次上CM-Sephadex C-50柱(1.5×88cm), 洗脱结果仅呈现一个蛋白峰,如图4,冻干后共得蛋白质55毫克,回收率为上柱量84.6%。2) 凝胶电泳试验: 用第三次CM-Sephadex C-50柱层析组份(L.G.V-C.Ⅲ-C.Ⅱ-C)进行电泳,结果如图5所示为单一区带。将L.G.V-C.Ⅲ-C.Ⅱ-C组份与粗毒及各次柱层析洗脱组份电泳结果作比较(见图5),并结合图4柱层析结果,最后所得L.G.V-C.Ⅲ-C.Ⅱ-C毒性组份已达到相当纯的程度。聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱比较见图6。

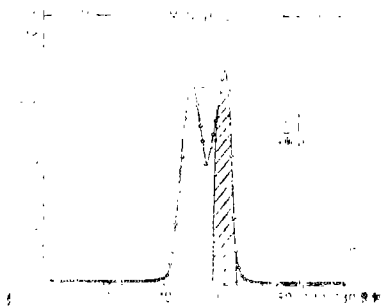


图3 平颀G.V-C.Ⅲ组份的CM-Sephadex C-50柱层析分离图

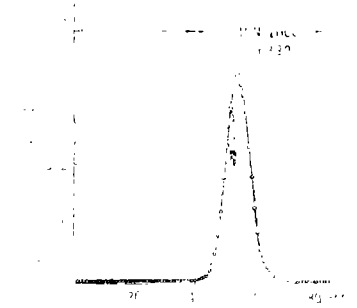


图4 平颀G.V-C.Ⅲ-C.Ⅱ组份的柱层析纯度鉴定图

② LD₅₀值测定。毒性组份经适当稀释后,用昆明种健康小白鼠(体重18~22克)每5只分为一组,腹腔注射 0.2 ± 0.1 毫升样品液,24小时内观察死亡情况,按几率单位目测法,以几率单位对剂量对数作图,求出毒性组份L.G.V-C.Ⅲ-C.Ⅱ-C半致死量(LD₅₀)为0.037mg/kg;同样方法测出平颀海蛇粗毒LD₅₀值为0.125mg/kg,均比目前国外A.T.Tu所报导平颀海蛇的神经毒素单一组份的LD₅₀为0.06mg/kg、粗毒LD₅₀值为1.4mg/kg要低得多*。

* A.T.Tu用i.v法即静脉注射法,本文用i.p法即腹腔注射法

(3)全毒各种酶活性测定及 L.G·Ⅳ-C·Ⅱ-C·Ⅰ-C 组份的初步生理效应

根据前文〔3〕所介绍的方法测定了粗毒中14种酶活性，其中具有较明显酶活力的有磷酸酶 A₂、DNA酶、RNA酶、透明质酸酶、核苷酸酶、胆碱酯酶、磷酸二酯酶、酸性与碱性磷酸酯酶。初步观察到平颞海蛇与青环海蛇全毒中有蛋白酶抑制剂的存在，而氨基酸氧化酶、精氨酸酯酶未被检出。在测定表现有活力的酶中均未经进一步提纯，很难以酶活力数值比较某种酶在蛇毒中含量的高低。

平颞海蛇蛇毒 L.G·Ⅳ-C·Ⅱ-C·Ⅰ-C 组均未经进一步提纯份对离体神经-隔肌标本收缩活动的阻滞效应，初步测定结果表明其作用方式类似于箭毒，但作用过程不为新斯的明逆转，电生理分析能减少青蛙离体坐骨神经-缝匠肌标本的终板电位，初步测定为突触后神经毒素。

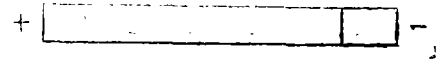


图5 L.G·Ⅳ-C·Ⅱ-C·Ⅰ-C组份的电泳图

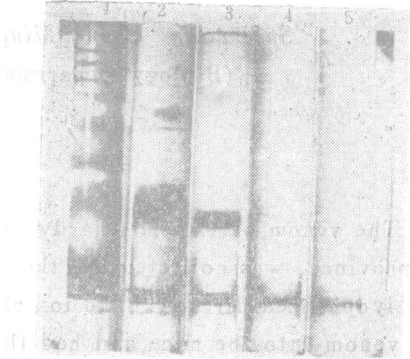


图6 平颞海蛇粗毒及各次柱层析分离组份电泳图谱 1. 平颞海蛇粗毒 2. L.G·Ⅳ 3. L.G·Ⅳ-C·Ⅱ 4. L.G·Ⅳ-C·Ⅱ-C·Ⅰ, 5. L.G·Ⅳ-C·Ⅱ-C·Ⅰ-C

参 考 文 献

〔1〕 Nobuo Tamiya, Sea Snake Venoms and Toxins, *The Biology of Seasnakes* (edited by William A. Dums n), 1975, University park press.
 〔2〕 A.T.Tu and B.S.Hong, *J.Bio.Chem.*, 246 (1971), 9, 2772~2779.
 〔3〕 苏拔贤、曾家荣等, *热带海洋*, 3 (1984), 4, 41~49.
 〔4〕 蔡武城等, *生物物质常用化学分析法*, 科学出版社, 1982, P.97.

Studies on the Components of *Lapemis Hardwickii* Venom

Zeng Jiarong Wu Shihai Pang Fuxiong Mo Youqun Xu Luyuan

(Institute of Oceanology Guangxi)

Su Baxian Chang Mingzhe Zhuo Zhaowen Lao Ziqian

(Biology Department of Zhongshan University)

Abstract

The venom of *Lapemis hardwickii*, captured at the gulfs of Beihai of Guangxi province, was collected by the method of Bitten-vessel from living snake and lyophilized directly. The toxicity was tested by injecting intra-peritoneally the venom into the mice and had the LD₅₀ value of 0.125 mg/kg.

The activities of fourteen enzymes from the crude venom were detected. Among them, DNase, Nucleotidase, Acetyl cholinase and Phospholipase A₂ appear high activity. No enzymatic activity of L-Amino acid Oxidase and Arginine esterase was detected. It was found that the inhibitor of proteinase exists, the same as in *H. cyanocinctus*. Four peaks were obtained by running the venom through Sephadex G-75 column. The major lethal peak was further purified by chromatography on CM-Sephadex C-50 for three times. Electrophoresis showed only one band of the final toxin which had 0.037mg/kg of LD₅₀ value. The toxin was determined as a postsynaptic toxin. Our result shows that the method for preparing the toxin of *H. Cyanocinctus* is also applicable to the purification of *L. Hardwickii's* venom.