

## 眼镜蛇毒中赖氨酸和精氨酸残基的荧光特性

周诗桂 李淑颜 李瑞骥 傅肖萍 赵延德 (广州医学院, 广州 550066)

**提要** 眼镜蛇毒的生物活性与其所含的赖氨酸、精氨酸有关。蛇毒中的赖氨酸是在 0.5% 茛三酮的中性溶液中作试验, 荧光波长为 450(407)nm; 蛇毒中的精氨酸是在 0.5% 茛三酮的碱性溶液中作试验, 荧光波长为 504 nm。并与纯赖氨酸、精氨酸对照, 其光谱特性相似。其含量比赖氨酸为 100:15, 精氨酸为 100:17。并对 6 种蛇毒水溶液(不加茛三酮)的荧光特性进行了试验。

**关键词** 眼镜蛇毒; 荧光分光光度法; 赖氨酸; 精氨酸; 茛三酮

将眼镜蛇毒经化学修饰赖氨酸残基后, 即失去抗血清对原毒素的反应; 赖氨酸经三硝基酚化, 则几乎完全失去毒性<sup>(1,2)</sup>。眼镜蛇毒的精氨酸残基被修饰后, 则失去生物活性<sup>(2)</sup>。鉴于赖氨酸、精氨酸与眼镜蛇毒的生物活性有密切关系, 为此, 我们用荧光法测定蛇毒中赖氨酸、精氨酸的特性, 作为检验眼镜蛇毒质量的方法之一。其优点为准确而快速。过去未见类似报道。

## 材料和方 法

**蛇毒** 眼镜蛇毒、金环蛇毒、银环蛇毒、眼镜王蛇毒、圆斑蝥蛇毒、蝮蛇毒干粉, 由广州医学院药理教研室采集。

**仪器和试剂** 日立厂 MPF-4 型荧光分光光度计、自动恒温水浴、赖氨酸(AR)、精氨酸(AR)、茛三酮(CP)、KOH(CP)。

## 眼镜蛇毒中赖氨酸和精氨酸荧光光谱试验

1. 赖氨酸残基<sup>(3)</sup> 于试管内加入 0.2 M 磷酸盐缓冲液 2 ml (pH 7), 0.5% 茛三酮溶液 0.2 ml, 0.002% 眼镜蛇毒水溶液 0.1 ml, 管口盖上铝箔, 在 60℃ 保温 60 min 后, 放入冰浴中 5 min, 然后再在室温放置 10 min, 测定荧

光, 激发光及发射光单色器的狭缝均为 10 nm 光谱带宽度。扫描速度为 60 nm/min, 纸速为 60 mm/min。然后用 0.002% 赖氨酸水溶液 0.1 ml 代替蛇毒水溶液, 用相同操作处理后, 扫描出光谱图。

2. 精氨酸残基<sup>(4,5)</sup> 在试管中加入 0.5% 茛三酮水溶液 2 ml, 0.002% 眼镜蛇毒水溶液 2 ml, 1 N KOH 溶液 2 ml, 避光放置 9-14 min, 测定激发光谱及荧光光谱。同时, 用 0.002% 精氨酸水溶液 2 ml 代替蛇毒水溶液, 用相同操作处理后, 扫描出光谱图。

**6 种蛇毒溶液荧光光谱试验** 取 0.002% 蛇毒(眼镜蛇毒、金环蛇毒、银环蛇毒、眼镜王蛇毒、圆斑蝥蛇毒、蝮蛇毒)水溶液, 不加试剂, 直接在荧光分光光度计中测定荧光光谱。

## 结 果

**赖氨酸及眼镜蛇毒的荧光特性比较** 赖氨酸的激发光顶峰为 357 nm, 荧光顶峰为 450(408)nm。眼镜蛇毒的激发光顶峰为 357 nm, 荧光顶峰为 450(407)nm(见图 1)。并对赖氨酸与眼镜蛇毒中的赖氨酸残基的含量作了初步的对比。当赖氨酸溶液的荧光强度为 100% 时, 蛇毒的荧光强度为 15%, 其含量之比为 100:15。若在上述眼镜蛇毒液中加入 10% 苦

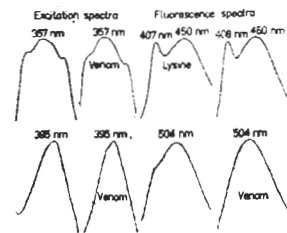


Fig 1. Excitation and fluorescence spectra of lysine and arginine in comparison with the venom of *Naja naja atra*

味酸溶液 1 ml 进行三硝基酚化, 则荧光消失。

**精氨酸及眼镜蛇毒的荧光特性比较** 精氨酸的激发光顶峰为 395 nm, 荧光顶峰为 504 nm。眼镜蛇毒的激发光顶峰为 395 nm, 荧光顶峰为 504 nm (见图 1)。精氨酸与蛇毒含量之比为 100:17。

**6 种蛇毒水溶液荧光特性的比较** 眼镜蛇毒激发光顶峰为 283 nm, 荧光顶峰为 339 nm; 金环蛇毒各为 283 nm, 331 nm; 银环蛇毒各为 283 nm, 334 nm; 眼镜王蛇毒各为 283 nm, 338 nm; 圆斑蝥蛇毒各为 286 nm, 332 nm; 蝮蛇毒各为 284 nm, 338 nm。

## 讨 论

赖氨酸、精氨酸本身不发生荧光, 但在一定的条件下加入茚三酮使其发生反应, 能形成一种荧光性产物。眼镜蛇毒中的赖氨酸、精氨酸残基在加入茚三酮处理后, 亦产生荧光, 其荧光光谱与游离赖氨酸、精氨酸的很相似。在荧光分析中, 可以对混合物中不同组分同时测定, 而不必经过分离手续, 这是利用混合物中各个不同组分的荧光峰之间存在着较大的距离, 分别在不同波长测定各个组分的荧光顶峰,

互相之间没有显著干扰, 这种不必经过分离而能同时测定混合物中数种组分, 是荧光分光光度法的优点之一。用此法测定眼镜蛇毒中的赖氨酸、精氨酸残基可得到较准确的荧光图谱及百分比含量。

根据 6 种蛇毒所含的蛋白质有芳香族氨基酸残基, 芳香族氨基酸本身就有天然荧光, 不必加茚三酮, 可直接测定, 蛇毒粗毒虽为蛋白质及多肽混合物, 因其中有天然荧光的成份不多, 波形简单而稳定, 重复性好, 方法简便, 可作为蛇毒粗毒的天然荧光特性的参考。

**致谢** 本院刘毅传和康寿芷老师对本工作给予热情支持和协助。

## 参 考 文 献

- 1 Boulain J-C, Couderc J, Perrodon Y, Liacopoulos P, Faure G, Fromageot P. *Toxicon* 1982; 20:115
- 2 赵延德. 广州医学院学报 1982; 35:61
- 3 Samejima K, Dairman W, Udenfriend S. *Anal Biochem* 1971; 42: 222
- 4 Conn RB Jr, Davis RB. *Nature* 1959; 183: 1053
- 5 Matsumoto T, Furuta T, Nimura Y, Suzuki O. *Biochem Pharmacol* 1982; 31: 2207

*Acta Pharmacologica Sinica* 1984 Sep; 5 (3): 164-165

## FLUORESCENCE CHARACTERISTICS OF LYSINE AND ARGININE RESIDUES IN VENOM OF NAJA NAJA ATRA

ZHOU Shi-gui, LI Shu-yan, LI Rui-ji, FU Xiao-ping, ZHAO Yan-de

(Guangzhou Medical College, Guangzhou 550066)

**ABSTRACT** The biological activity of venom of *Naja naja atra* is related to lysine and arginine residues contained in the venom. Lysine residues in the venom was tested in a neutral 0.5% ninhydrin solution, and the fluorescence wavelength was found to be 450 (407) nm. Arginine residues in the venom was tested in an alkaline 0.5% ninhydrin solution, and the fluorescence wavelength was found to be 504

nm. The excitation and fluorescence spectra of the venom were found to be similar to those of free lysine and arginine.

Fluorescence characteristics of the venoms of 6 common snakes in aqueous solution without adding ninhydrin were also examined.

**KEY WORDS** cobra venoms; fluorescence spectrometry; lysine; arginine; ninhydrin