

# 日本蝮蛇蛇毒碱性磷脂酶 A<sub>2</sub> 同源物的分离及鉴定\*

杨巍 包永明\*\* 段延龙 安利佳

(大连理工大学生物工程系, 大连 116024)

## Purification and characterization of phospholipase A<sub>2</sub> homologue from the manushi

(*Agkistrodon blomhoffii ussurensis*) snake venom\*

YANG Wei BAO Yong-Ming\*\* DUAN Yan-Long An Li-Jia

(Department of Biochemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

**Abstract** We purified and characterized a phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* snake venom. We used Hitrap SP cation exchange and Superdex 75 columns chromatography to obtain a basic protein, used SDS-PAGE to analyse molecular mass, and IEF (Isoelectric focusing electrophoresis) IEF to identify isoelectric point. The molecular mass was 16 kDa, and the isoelectric point was 8.56. We detected its phospholipase A<sub>2</sub> activity on egg yolk phospholipids, hemolytic activity on washed erythrocytes, and anticoagulant effect on pig platelet-rich plasma, as well as the N-terminal sequence with protein sequencer. The results showed that it had no phospholipase A<sub>2</sub> activity and hemolytic activity, but had obvious anticoagulant effect on *in vitro*. The N-terminal sequence (21 amino acid residues) compared with other phospholipases A<sub>2</sub> demonstrated that the protein was homogenous with BPLA<sub>2</sub>S from *Agkistrodon halys Palls* [Acta Zoologica Sinica 49 (5): 704 - 707, 2003].

**Key words** Manushi (*Agkistrodon blomhoffii ussurensis*), Basic phospholipase A<sub>2</sub>, Snake venom, Anticoagulant activity

**关键词** 日本蝮蛇 碱性磷脂酶 A<sub>2</sub> 蛇毒 抗凝血活性

磷脂酶 A<sub>2</sub> (Phospholipase A<sub>2</sub>, PLA<sub>2</sub>) 能特异水解磷酸甘油酯的 sn-2 位脂酰键, 生成溶血磷脂和脂肪酸 (张海龙等, 2000), 这种酶几乎存在于所有蛇的毒液中。因蛇的种类及生活环境的不同, PLA<sub>2</sub> 的结构和功能也有很大的差异。目前, 根据第 49 位氨基酸的不同, PLA<sub>2</sub> 又可以分为 Asp49 PLA<sub>2</sub> 和 Lys49 PLA<sub>2</sub> 两种类型, 前者有明显的 PLA<sub>2</sub> 水解活性, 而后者没有或活性很低, 所以又把它称为 Lys49 PLA<sub>2</sub> 同源物 (Li *et al.*, 1994)。此外, Krizaj *et al.* (1991) 还从 *Vipera ammodytes* 蛇毒中分离出了 Ser49 PLA<sub>2</sub> 同源物。孙明忠 (1999) 和李伟国 (2001) 等曾分别从日本蝮蛇 (*Agkistrodon blomhoffii ussurensis*) 粗毒中分离提纯出有酶水解活性的 PLA<sub>2</sub>, 但还没有研究报道从该蛇毒中分离出无酶活性的 PLA<sub>2</sub> 同源物。本文报道的是从日本蝮蛇粗毒中分离得到一种碱性 PLA<sub>2</sub>

同源物, 并对该蛋白质的生物活性进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和仪器

日本蝮蛇粗毒购自吉林辉南县蛇园, Hitrap SP 阳离子交换柱、Superdex 75 凝胶过滤介质及 ÄKTA Explorer 100 蛋白质层析仪均为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品, 等电聚焦电泳仪 DYY- 型水平电泳槽为北京六一仪器厂产品, 卵磷脂购自上海百泰化学科技有限公司, 其它试剂均为分析纯试剂。

### 1.2 蛋白质的分离和纯化

取粗毒 0.1 g 溶于 1 ml 10 mmol/L pH 7.2 的 Tris-HCl 缓冲液 A 中, 上样到用同样的缓冲液平衡的 5 ml Hitrap SP 阳离子交换柱上, 然后用 B 液 (A 液中加入 1 mol/L KCl) 梯度洗脱, 得到 5 个

2003-01-03 收稿, 2003-06-26 修回

\*\* 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: yongmingbao@sohu.com

第一作者简介 杨巍, 女, 29 岁, 硕士。研究方向: 生物化学。E-mail: ywei-v@sina.com

© 2003 动物学报 Acta Zoologica Sinica

峰，将峰 4 收集并用 10 kDa 截留量的超滤膜超滤浓缩，浓缩样品上样到 Superdex 75 (60 cm × 1.6 cm) 柱，凝胶过滤平衡液为 50 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, pH 7.2, 收集目的峰 4-3, 经浓缩、脱盐、冻干保存。

### 1.3 分子量和等电点的测定

按照 Laemmli (1970) 的方法，利用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)，测定该蛋白质的分子量，参照夏其昌 (1999) 薄层等电聚焦电泳法 (Isoelectric focusing electrophoresis, IEF) 测定等电点。

### 1.4 N 末端序列分析

N 末端 21 个氨基酸序列由军事医学科学院测定。

### 1.5 PLA<sub>2</sub> 活性的测定

采用 Kawauchi *et al.* (1971) 的方法加以改良，称取卵磷脂 1 g，用少量的乙醚溶解，加双蒸水 20 ml，25 °C 水浴真空蒸发 10 min 除乙醚，再加双蒸水 20 ml，置于超声波发生器中冰浴乳化 40 min，加 0.05 mol/L 脱氧胆酸钠 2 ml，0.5 mol/L CaCl<sub>2</sub> 2 ml，2.5 mol/L NaCl 4 ml，加水至 90 ml，用 0.02 mol/L KOH 调 pH 至 8.2，定容至 100 ml，以此作为底物。测活时取 12 ml 新鲜配制的底物，搅拌，加入 PLA<sub>2</sub> 的同时计时，用 0.02 mol/L KOH 中和水解产生的脂肪酸，维持 pH 8.2，根据每毫克 PLA<sub>2</sub> 消耗 KOH 的速度求出 PLA<sub>2</sub> 的活力。

### 1.6 抗凝血活性的测定

取新鲜的枸橼酸钠抗凝猪血，1 000 g 离心 10 min，得富含血小板血浆 (PRP)，取 PRP 0.5 ml，与 0.1 ml 含不同浓度的分离 PLA<sub>2</sub> 同源物 (0.1, 0.2, 0.4 或 0.6 g/L) 的 PBS 溶液 37 °C 孵育 10 min，加入 0.1 ml 0.25 mol/L CaCl<sub>2</sub>，记录凝血时间。

### 1.7 间接溶血活性的测定

新鲜猪血的红细胞经生理盐水洗涤 3 次，每次 4 000 r/min 离心去上清。称取 50 mg 卵磷脂悬浮于 50 ml 含 10 mmol/L Ca<sup>2+</sup>，9 g/L NaCl, pH 7.2 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中，超声处理 30 min 使其乳化，加红细胞达体积比为 5%，混匀。活性测定时，每次取 1 ml 溶液，加不同浓度的分离蛋白质 37 °C 孵育 15 min，4 000 r/min 离心 5 min，取上清测 OD<sub>540</sub>，以 1% TritonX-100 全溶血为 100% 溶血率，按溶血的百分比计算溶血度。

## 2 结果

### 2.1 PLA<sub>2</sub> 同源物的分离纯化及鉴定

日本蝮蛇粗毒经 Hitrap SP 阳离子交换分离得到 5 个峰 (图 1: a)，将峰 4 浓缩后经 Superdex 75 凝胶过滤得到目的峰 4-3 (图 1: b)，收集目的蛋白质。该蛋白经 SDS-PAGE 检测为一条带，分子量为 16 kDa 左右 (图 2: a)。经等电聚焦检测，其等电点为 8.56 (图 2: b)。

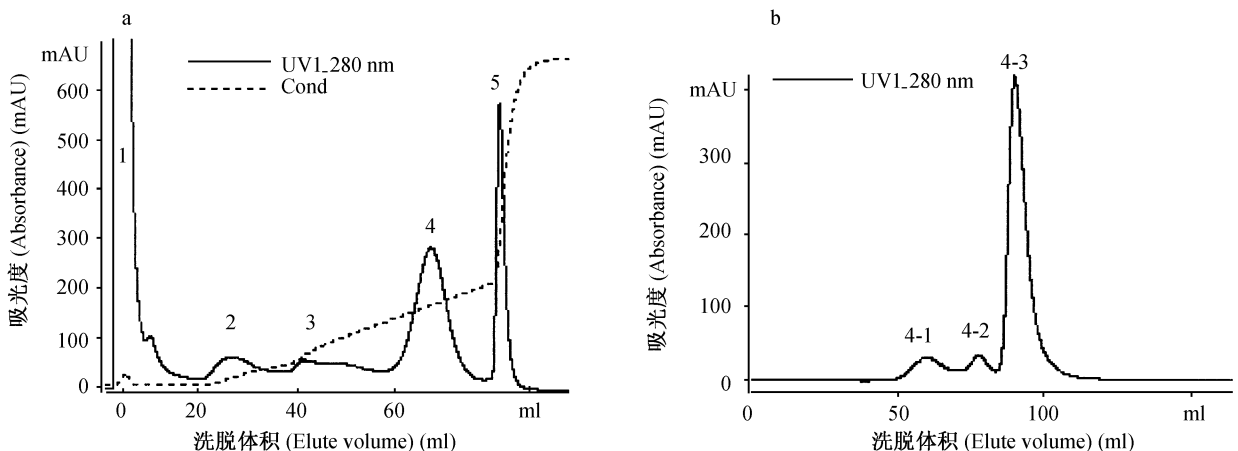


图 1 日本蝮蛇 PLA<sub>2</sub> 同源物的分离和纯化

Fig. 1 Separation and purification of phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Agkistrodon blomhoffii ussuriensis* snake venom

a. 日本蝮蛇粗毒的 Hitrap SP 阳离子交换层析图谱 (Cation exchange chromatogram of the crude venom from *Agkistrodon blomhoffii ussuriensis* snake on Hitrap SP column) b. 阳离子交换层析得到的峰 4 再经 Superdex75 凝胶过滤得到的层析图谱 (Superdex 75 gel filtration chromatogram of peak 4 from cation exchange chromatography)

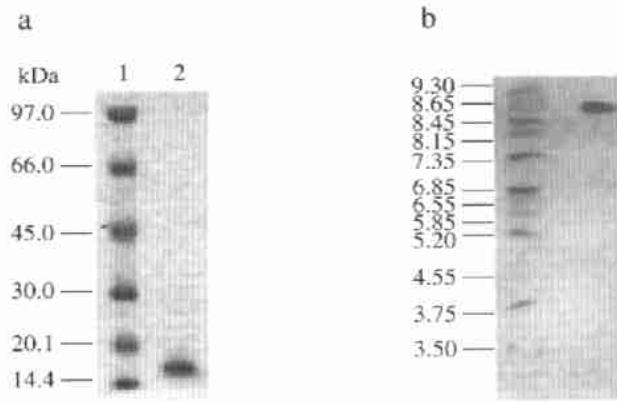


图 2 日本蝮蛇蛇毒 PLA<sub>2</sub> 同源物的电泳分析

Fig. 2 Electrophoresis analysis of phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* venom

a. SDS-PAGE (12 %) 1: 标准分子量蛋白 (Standard molecular mass proteins) 2: PLA<sub>2</sub> 同源物 (PLA<sub>2</sub> homologue) b. 等电聚焦电泳 (Isoelectricfocusing electrophoresis) 1: 标准等电点蛋白 (Standard isoelectric point proteins) 2: PLA<sub>2</sub> 同源物 (PLA<sub>2</sub> homologue)

2.2 PLA<sub>2</sub> 活性及溶血活性

按照 Kawauchi *et al.* (1971) 的方法, 以卵磷脂为底物, 检测不到 PLA<sub>2</sub> 的活性 (蛋白质量已加到 1 mg), 也不能检测到溶血活性。

2.3 抗凝血活性

日本蝮蛇 PLA<sub>2</sub> 同源物在较低浓度 (0.1 mg/ml) 时, 对复钙时间略有降低, 但当浓度高于 0.2 mg/ml 时, 随 PLA<sub>2</sub> 同源物浓度的增加, 复钙时间延长 (图 3)。

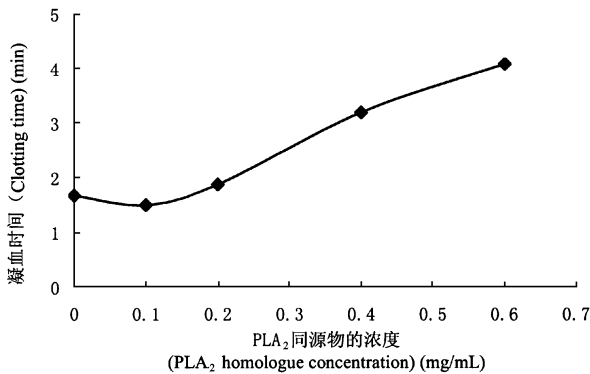


图 3 日本蝮蛇蛇毒 PLA<sub>2</sub> 同源物的抗凝血作用

Fig. 3 The anticoagulant effect of phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*

3 讨论

日本蝮蛇 PLA<sub>2</sub> 同源物 N 末端序列分析结果为 SLLQFRKMIKKMTGKEPVVSY, 与江浙蝮蛇中分离出的碱性磷脂酶 A<sub>2</sub> N 端 21 个氨基酸残基序列完全相同 (潘华等, 1996), 与烙铁头蛇

(*Trimeresurus mucroquamatus*) 蛇毒 TMPB 的同源性为 85.7% (Xu *et al.*, 1999), 但与烙铁头蛇毒 PA<sub>2</sub>B-TRIMU (Lys49 PLA<sub>2</sub>) 的同源性较低 (52.4%) (Angulo *et al.*, 2002) (表 1)。

表 1 日本蝮蛇蛇毒 PLA<sub>2</sub> 同源物与其它几种 PLA<sub>2</sub> 的序列比较

Table 1 N-terminal amino acid sequence of PLA<sub>2</sub> homologue from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* compared with several other PLA<sub>2</sub>s

| PLA <sub>2</sub> 的来源 (PLA <sub>2</sub> source) | N 末端氨基酸残基序列 (N-terminal sequence) | 同源性 (Similarity) |
|--|-----------------------------------|------------------|
| 1  | SLLQFRKMIK KMTGKEPVVSY            | 100 %            |
| 2  | SLLQFRKMIK KMTGKEPVVSY            | 100 %            |
| 3  | NLLQFRKMIK KMTGKEPILSY            | 85.7 %           |
| 4  | SLIELGKMIF QETGKNPVKNY            | 52.4 %           |

1: 日本蝮蛇 PLA<sub>2</sub> 同源物 (PLA<sub>2</sub> homologue from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*) 2: 江浙蝮蛇 BPLA<sub>2</sub> (BPLA<sub>2</sub> from *Agkistrodon halys* Pallas) 3: 烙铁头蛇 TMPB (TMPB from *Trimeresurus mucroquamatus*) 4: 烙铁头蛇 PA<sub>2</sub>B-TRIMU (PA<sub>2</sub>B-TRIMU, *Trimeresurus mucrosquamatus*) (Angulo *et al.* 2002)

近些年来, 人们已从多种蛇毒中分离出 Asp49 PLA<sub>2</sub> 和 Lys49 PLA<sub>2</sub> 的同源物, 并对它们的一级结构及酶活性性质进行了研究, 目前普遍认为 PLA<sub>2</sub> 的酶活性与 Ca<sup>2+</sup> 的结合环的形成有关, 当第 49 位的天冬氨酸被赖氨酸替代, 破坏了 Ca<sup>2+</sup> 结合环的形成及钙的结合, 因此影响了 PLA<sub>2</sub> 的酶水解活性 (Angulo *et al.*, 2002; de Sousa *et al.*, 1998)。我们从日本蝮蛇蛇毒中分离出的 PLA<sub>2</sub> 同源物与江浙

蝮蛇的 PLA<sub>2</sub> 有很高的同源性, 但没有 PLA<sub>2</sub> 活性, 原因可能是结合钙的关键氨基酸残基改变所致。

PLA<sub>2</sub> 的抗凝血活性是否与酶活性有关一直存在着争论, 一些研究认为 PLA<sub>2</sub> 活性与抗凝血活性有关, 因为对 His48 烷基化修饰可以使 PLA<sub>2</sub> 酶活性和抗凝活性都大幅度下降 (D'áz-Oreiro *et al.*, 1997), 有些无 PLA<sub>2</sub> 活性的 PLA<sub>2</sub> 同源物, 也无抗凝血活性 (Angulo *et al.*, 2000); 但也有一些研究认为, PLA<sub>2</sub> 的抗凝血活性位点与酶的催化位点相互独立 (Soares *et al.*, 2001)。从日本蝮蛇中分离出的 PLA<sub>2</sub> 同源物没有 PLA<sub>2</sub> 活性, 但有明显的抗凝血活性, 能够显著地延长血浆的复钙时间, 这一结果也证实了存在单独的抗凝血活性位点。

### 参考文献 (References)

- Angulo, Y., T. Olamendi-Portugal, L. D. Possani and B. Lomonte 2000 Isolation and characterization of myotoxin from *Atropoides (Bothrops) nummifer* snake venom, a new Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**: 63 ~ 71.
- Angulo, Y., T. Olamendi-Portugal, A. Alape-Grón, L. D. Possani and B. Lomonte 2002 Structural characterization and phylogenetic relationships of myotoxin from *Atropoides (Bothrops) nummifer* snake venom, a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**: 1 268 ~ 1 278.
- D'áz-Oreiro, C. and J. M. Gutiérrez 1997 Chemical modification of histidine and Lysine residues of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops asper* and *Bothrops godmani* snake venoms: effects on enzymatic and pharmacological properties. *Toxicon* **35** (2): 241 ~ 252.
- Kawauchi, S., S. Iwanaga, Y. Samejima and T. Suzuki 1971 Isolation and characterization of two phospholipase A<sub>2</sub>'s from the *Agkistrodon halys blomhoffii*. *Biochimica et Biophysica Acta* **263**: 142 ~ 160.
- Krizaj, I., A. L. Bieber, A. Ritonja and F. Gubensek 1991 The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Vipera ammodytes* venom. *Eur. J. Biochem.* **202**: 1 165 ~ 1 168.
- Laemmli, U. K. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680 ~ 685.
- Li, W. G., D. Q. Zhao and J. Z. Ni 2001 A calcium/calmodulin dependent phospholipase A<sub>2</sub> obtained from Chinese *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* venom. *Chinese Journal of Applied Chemistry* **18** (9): 681 ~ 684. [李伟国, 赵大庆, 倪嘉贻 2001 一种钙/钙调蛋白依赖性的蛇毒磷脂酶 A<sub>2</sub>. *应用化学* **18** (9): 681 ~ 684.]
- Li, Y., B. Z. Yu, H. Zhu, M. K. Jain and M. D. Tsai 1994 Phospholipase A<sub>2</sub> engineering: structural and functional roles of the highly conserved active site residue aspartate-49. *Biochemistry* **33**: 14 714 ~ 14 722.
- Pan, H., L. L. Ouyang, G. Z. Yang, Y. C. Zhou and X. F. Wu 1996 Cloning of the BPLA<sub>2</sub> gene from *Agkistrodon halys* Pallas. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **28** (6): 579 ~ 582. [潘华, 欧阳莉莉, 杨冠珍, 周元聪, 吴祥甫 1996 蝮蛇毒碱性磷脂酶 A<sub>2</sub> 基因的克隆. *生物化学与生物物理学报* **28** (6): 579 ~ 582.]
- Soares, A. M., A. C. Mancin, A. L. Cecchini, E. C. Arantes, S. C. Franca, J. M. Gutiérrez and J. R. Giglio 2001 Effects of chemical modification of crotoxin B, the phospholipase A<sub>2</sub> subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **33**: 877 ~ 888.
- de Sousa, M. V., L. Morhy, R. K. Arni, R. J. Ward, C. D'áz and J. M. Gutiérrez 1998 Amino acid sequence of a myotoxic Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1 384**: 204 ~ 208.
- Sun, M. Z., L. Ding, D. Q. Zhao and J. Z. Ni 1999 Purification and characterization of a phospholipase A<sub>2</sub> from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* of Changbai Mountains. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **31** (1): 104 ~ 106. [孙明忠, 丁兰, 赵大庆, 倪嘉贻 1999 长白山白眉蝮蛇蛇毒磷脂酶 A<sub>2</sub> 的分离和初步表征. *生物化学与生物物理学报* **31** (1): 104 ~ 106.]
- Xia, Q. C. 1999 Research Technique and Progress for Protein Chemistry. Beijing: Science Publishing House, 105. [夏其昌 1999 蛋白质化学研究技术与进展. 北京: 科学出版社, 105.]
- Xu, T. R., W. Y. Wang, Q. X. Meng and Y. H. Huang 1999 A novel myotoxin from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **31** (5): 483 ~ 488.
- Zhang, H. L., Z. J. Lin, X. Y. Du and Y. C. Zhou 2000 Purification, crystal growth and preliminary X-ray analysis of a phospholipase A<sub>2</sub> from venom of *Agkistrodon acutus*. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **32** (4): 337 ~ 341. [张海龙, 林政炯, 杜晓燕, 周元聪 2000 尖吻蝮蛇酸性磷脂酶 A<sub>2</sub> 的纯化和初步晶体学. *生物化学与生物物理学报* **32** (4): 337 ~ 341.]