

蓖麻毒蛋白的分离纯化及其对南方根结线虫杀灭效果的研究

金汝城, 贾超, 杨晓华, 谭玉玲, 侯楠楠

【摘要】

目的 探讨蓖麻毒蛋白对南方根结线虫的杀灭效果。

方法 蓖麻子经脱壳后脱脂, 冰浴下在磷酸缓冲溶液中搅拌提取 2 h, 用硫酸铵沉淀得到粗蓖麻毒蛋白, 测定并计算浓度; 通过葡聚糖 G-200 柱分离纯化蓖麻毒蛋白, 测定并计算浓度; 采用小叶碟添加法测定杀灭南方根结线虫的效果; 并对蓖麻毒蛋白的血细胞凝集活性进行测定。

结果 分离纯化得到蓖麻毒蛋白的 3 个组分, 组分 2 的毒性比组分 1 的毒性强, 组分 3 的杀灭效果不显著。

结论 蓖麻毒蛋白杀灭南方根结线虫的效果良好, 在生物农药方面具备良好的应用前景。

【关键词】 毒力; 血凝集试验; 小叶碟添加法

www.cmbp.net.cn

中国医药生物技术, 2008, 3(4):293-296

蓖麻又称大麻子、红麻等, 是大戟科蓖麻属植物, 主要分布于非洲、亚洲等。我国蓖麻资源丰富, 种植面积约 700 万亩^[1]。蓖麻的种子(蓖麻子)榨油后可剩余 50% 的蓖麻饼粕, 饼粕脱脂后含有 35% 左右的蛋白质, 其中蓖麻毒蛋白含量较多^[2]。蓖麻毒蛋白作为生物农药杀虫后在虫体内可以自然分解, 不再危及下级食物链, 可以解决农药残留的污染问题, 因此蓖麻毒蛋白在生物农药方面有着独特的优势和广阔的应用前景。但是目前国内外针对蓖麻毒蛋白的研究主要集中于医学应用研究, 特别是用于生物导弹药的开发研究, 而针对生物农药方面的研究还比较少。本研究通过对蓖麻毒蛋白杀灭南方根结线虫的效果进行研究, 期望为开发研究新型生物农药奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

蓖麻子于 2007 年 5 月购于兰州市黄河药品批发市场, 产于陕西渭南; 南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*) 来源于甘肃省白银市水川乡蒋家湾村蔬菜大棚中染病黄瓜植株, 由甘肃省农业科学院植物保护研究所李继平研究员鉴定; 绵羊新鲜血液取自

兰州市穆斯林牛羊肉市场定点屠宰场。磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、聚乙二醇 6000 均购自天津市百世化工有限公司; 葡聚糖 G-200 购自广州伟伯化工有限公司; D-半乳糖购自上海史瑞可生物科技有限公司; 生理盐水(注射剂)购自兰州大得利生化制药厂; MD25 透析袋购自北京索莱宝科技有限公司。HL-2 恒流泵购自上海精科实业有限公司; UV-9200 紫外分光光度计购自北京瑞利分析仪器公司。

1.2 方法

1.2.1 PBS 缓冲液的配制 0.2 mol/L 的磷酸二氢钠和磷酸氢二钠按体积比 77:23 混合后, 用 0.1 mol/L 的磷酸调节 pH 于 6.0~7.5 之间^[3]。本实验 PBS 缓冲液 pH 为 7.0。

1.2.2 蓖麻毒蛋白的提取 将剥壳的蓖麻子放入乙醚中搅拌浸泡脱脂, 由 PBS 溶液冰浴中搅拌提取 2 h, 经 60% 硫酸铵沉淀得粗蓖麻毒蛋白。粗蓖麻毒蛋白在冷水中用 MD25 透析袋透析 24 h 除盐, 聚乙二醇 6000 覆盖透析袋浓缩 3 h, 2260 × g 离心 10 min, 取上清液在 280 nm 和 260 nm 处测定吸光度(A)值, 代入公式 $I(\text{浓度}) = 1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}$ 计算浓度^[4]。

1.2.3 蓖麻毒蛋白的分离纯化 将葡聚糖 G-200 装柱(3 cm × 32 cm), 加装恒流泵, 设置流速为 1 ml/min。用 PBS 缓冲液平衡后, 粗蓖麻毒蛋白溶液 20 ml 上样于柱子, 按 1.2.2 的方法测定并计算粗蓖麻毒蛋白溶液的浓度。

再用 PBS 缓冲液洗脱, 每管收集 10 ml, 共收集 85 管。把 280 nm 处吸光度(A)值较高的管合并, 则用 PBS 缓冲液洗脱时分离出组分 1 和组分 2; 待洗脱液 280 nm 的 A 值下降至小于 0.1 时, 改用含 0.1 mol/L D-半乳糖的 PBS 缓冲液继续洗脱, 每管收集 5 ml, 共收集 80 管, 则洗脱分

作者单位: 730050 兰州理工大学生命科学与工程学院

通讯作者: 金汝城, Email: jinrucheng@lut.cn

收稿日期: 2008-06-12

离得到组分 3，用 1.2.2 的方法测定其浓度。

1.2.4 蓖麻毒蛋白毒理的测定 采用小叶碟添加法^[5]进行杀灭南方根结线虫的毒力实验，共 99 个表面皿，每个表面皿中放入 10 只南方根结线虫，以自来水、PBS 缓冲溶液作为空白对照组，组分 1、组分 2、组分 3 的 0 倍、10 倍和 50 倍稀释液作为实验组，每个表面皿中喷洒 5 ml 供试液体，观察 12 h、1 d、2 d 的杀灭率，即测出表面皿中南方根结线虫的死亡个数。每个实验(记作 I)做 2 个平行(分别记为 II、III)，均采用喷洒给药，间隔 15 min 喷洒 1 次，每次 1 ml。

1.2.5 蓖麻毒蛋白的血细胞凝集活性的测定 绵羊新鲜血液 184 × g 离心 10 min，取沉淀绵羊红细胞，用生理盐水洗 3 次，配成 A₅₂₀ 为 1.93 的红细胞悬液^[6]；在相同条件下取粗蓖麻毒蛋白进行血细胞凝集素实验检验其凝集活性。分别设置 0.5 ml 生理盐水作为空白对照、0.5 ml PBS 溶液作为对照组(0.1 mol/L, pH 7.0)、组分 1、组分 2、组分 3 蛋白溶液和 3 个组分平行实验，每组 3 个，实验各孔均加入 0.5 ml 红细胞悬液和 0.5 ml 各待测蓖麻毒蛋白溶液，观察在室温下放置 6 h 后的结果。组分 1、组分 2、组分 3 的上样浓度均为 0.020 mg/ml。

2 结果

2.1 蓖麻毒蛋白的分离纯化和毒理的测定

粗蓖麻毒蛋白溶液浓度为 0.926 mg/ml。组分 1 和组分 2 浓度分别为 0.262、0.092 mg/ml(图 1)；组分 3 浓度 0.132 mg/ml(图 2)。由表 1 可以看

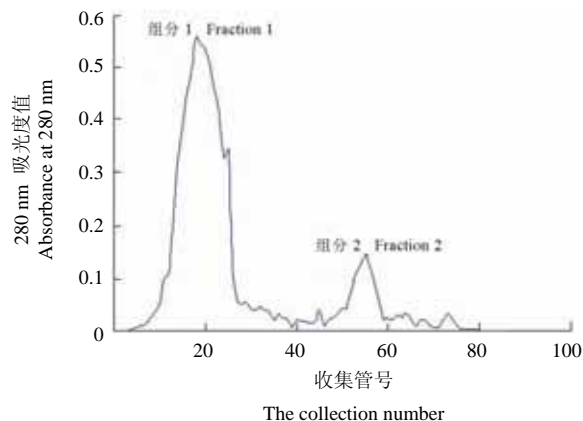


图 1 通过葡聚糖 G-200 柱用 PBS 缓冲液洗脱组分 1 和 2 的分离纯化图

Figure 1 Fractions 1 and 2 purified by PBS buffer using glucan G-200

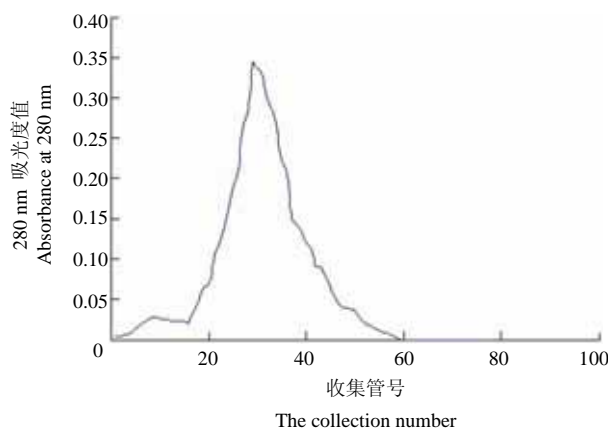


图 2 通过葡聚糖 G-200 柱用 0.1 mol/L D-半乳糖的 PBS 缓冲液洗脱组分 3 的分离纯化图

Figure 2 Fraction 3 purified by PBS buffer of D-galactose (0.1 mol / L) using glucan G-200

表 1 蓖麻毒蛋白不同组分杀灭南方根结线虫的实验结果

Table 1 Different fraction of ricin killing the South *Meloidogyne incognita* results

编号 Number	时间 Time	自来水 Tap water	PBS 缓 冲液 PBS buffer	组分 1 Fraction 1			组分 2 Fraction 2			组分 3 Fraction 3		
				0 倍稀 释 0-fold dilution	10 倍稀 释 10-fold dilution	50 倍稀 释 50-fold dilution	0 倍稀 释 0-fold dilution	10 倍稀 释 10-fold dilution	50 倍稀 释 50-fold dilution	0 倍稀 释 0-fold dilution	10 倍稀 释 10-fold dilution	50 倍稀 释 50-fold dilution
I	12 h	10+ 0-	10+ 0-	7+ 3-	9+ 1-	7+ 3-	7+ 3-	9+ 1-	7+ 3-	10+ 0-	10+ 0-	10+ 0-
	1 d	10+ 0-	10+ 0-	0+ 10-	0+ 10-	2+ 8-	0+ 10-	0+ 10-	1+ 9-	9+ 1-	10+ 0-	10+ 0-
	2 d	9+ 1-	8+ 2-	0+ 10-	0+ 10-	0+ 10-	0+ 10-	0+ 10-	0+ 10-	7+ 3-	8+ 2-	8+ 2-
II	12 h	10+ 0-	10+ 0-	8+ 2-	9+ 1-	7+ 3-	7+ 3-	9+ 1-	7+ 3-	10+ 0-	10+ 0-	10+ 0-
	1 d	10+ 0-	9+ 1-	0+ 10-	0+ 10-	3+ 7-	0+ 10-	0+ 10-	1+ 9-	10+ 0-	10+ 0-	10+ 0-
	2 d	10+ 0-	9+ 1-	0+ 10-	0+ 10-	0+ 10-	0+ 10-	0+ 10-	0+ 10-	8+ 2-	9+ 1-	8+ 2-
III	12 h	10+ 0-	10+ 0-	7+ 3-	9+ 1-	8+ 2-	6+ 4-	9+ 1-	7+ 3-	10+ 0-	10+ 0-	10+ 0-
	1 d	10+ 0-	9+ 1-	0+ 10-	0+ 10-	1+ 9-	0+ 10-	0+ 10-	0+ 10-	9+ 1-	9+ 1-	10+ 0-
	2 d	10+ 0-	8+ 2-	0+ 10-	0+ 10-	0+ 10-	0+ 10-	0+ 10-	0+ 10-	7+ 3-	8+ 2-	8+ 2-

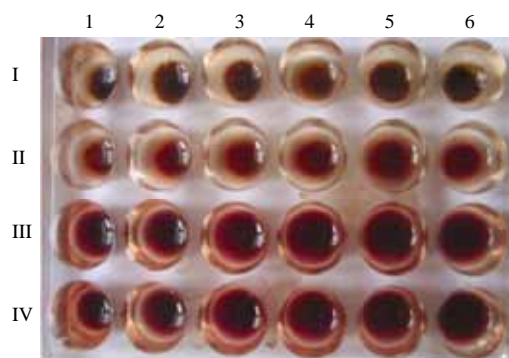
注：II 和 III 为平行试验；“+”代表存活，“-”代表死亡

Notes: II and III were parallel tests; +: Survived; -: Dead.

出组分 2 的毒性要比组分 1 的毒性强, 分离出的 2 组组分对南方根结线虫的杀灭率都较高, 但 12 h 的杀灭率不显著, 1 d 后的杀灭率接近 100%, 而组分 3 的毒性比较弱, 杀灭南方根结线虫的效率较低, 灭虫效果不显著。

2.2 蓖麻毒蛋白的血细胞凝集活性的测定

生理盐水、PBS 缓冲液和组分 3 使红细胞凝集的半径均较小, 添加组分 1 和组分 2 的各孔中的红细胞凝集的半径较大; 同时可以看出生理盐水、PBS 缓冲液和组分 3 各孔中的凝集的血红细胞颜色较深, 呈暗红, 而添加组分 1 和组分 2 的各孔中的红细胞颜色较鲜艳, 呈鲜红色; 组分 2 中红细胞的凝集半径较组分 1 的大, 红细胞凝集后的颜色也更鲜红(图 3)。可以看出组分 2 毒蛋白凝集活性最强, 其次为分离出的组分 1 毒蛋白, 而分离出的组分 3 蛋白凝集活性较小。



注: I₁、I₂、I₃: 为空白对照组 (0.5 ml 生理盐水); I₄、I₅、I₆: 为 PBS 溶液对照组 (0.5 ml); II₁、II₂、II₃: 为加入分离出的组分 3 的毒蛋白溶液; II₄、II₅、II₆: 为加入分离出的组分 3 的毒蛋白溶液平行实验; III₁、III₂、III₃: 为加入分离出的组分 1 的毒蛋白溶液; IV₁、IV₂、IV₃: 为加入分离出的组分 1 的毒蛋白溶液平行实验; III₄、III₅、III₆: 为加入分离出的组分 2 的毒蛋白溶液; IV₄、IV₅、IV₆: 为加入分离出的组分 2 的毒蛋白溶液平行实验

Notes: I₁, I₂, and I₃: Blank control (0.5 ml PBS); I₄, I₅, and I₆: PBS control group (0.5 ml); II₁, II₂, and II₃: Added with fraction 3; II₄, II₅, and II₆: Parallel test of II₁, II₂, and II₃; III₁, III₂, and III₃: Added with fraction 1; IV₁, IV₂, and IV₃: Parallel test of III₁, III₂, and III₃; III₄, III₅, and III₆: Added with fraction 2; IV₄, IV₅, and IV₆: Parallel test of III₄, III₅, and III₆.

图 3 粗蓖麻毒蛋白的血细胞凝集素试验结果

Figure 3 Hemagglutination test of rough ricin protein

3 讨论

血细胞凝集试验中由于蓖麻毒蛋白与红细胞表面的相应的受体结合后改变了红细胞的生理生化特性, 使得红细胞的沉降速率上升, 所以在单位时间内沉降较慢, 沉降半径较大, 同时由于蓖麻毒蛋白与红细胞表面受体结合后, 减缓了红细胞被空气中氧气氧化的速率, 使得在相同时间内

其中的红红细胞的颜色比较鲜红。蓖麻毒蛋白的活性越强红红细胞的沉降速率加大, 并且可以看出随着分离出各组分的上样浓度的减小其红红细胞的凝集半径和凝集后颜色也有不同, 其凝集半径变小, 颜色变得较暗淡, 这也说明分离出的各组分蓖麻毒蛋白的活性与浓度有着相关性。在上样浓度和体积相同的情况下, 每一待测液的血细胞凝集效果有明显得不同。实验结果与杀灭南方根结线虫的效果相一致。

本研究通过对蓖麻毒蛋白杀灭南方根结线虫的实验验证了蓖麻毒蛋白对南方根结线虫具有较高的杀灭率。将血凝集试验和蓖麻毒蛋白的杀虫实验结合起来能够直观的看出蓖麻毒蛋白的活性, 以及杀虫效果与其浓度均有相关性, 这对蓖麻毒蛋白用于相应的生物农药开发具有较高的应用和参考价值。对蓖麻毒蛋白的杀虫机制还没有进行研究, 也未对杀虫后蓖麻毒蛋白在虫体中的残留与分解进行实验。如果对上述实验进行深入的研究将对蓖麻毒蛋白用于生物农药的开发奠定良好的基础。

实验结果表明, 从蓖麻子中分离得到的相关组分的凝集活性与相关文献报道基本一致^[6], 本试验设计的杀灭线虫试验模型, 基本上反映了蓖麻毒蛋白的生物活性特征, 结果与其凝集活性没有冲突, 杀灭实验数据说明, 从粗蓖麻子分离出的蓖麻毒蛋白杀灭南方根结线虫效果较好, 特别是分离出的组分 2 蓖麻毒蛋白杀虫效果最好, 有望成为毒杀南方根结线虫的生物农药, 同时, 本实验室得到的分离提取工艺过程比较简单, 且优化了相应的条件, 有一定的应用价值, 为进一步开发新型生物农药科作为参考, 可以利用它来开发新型的杀灭南方根结线虫的药物。

参考文献

- [1] Zhao D, Xie DP. Research progress in Ricin. J Cereals Oils, 2005, (5): 3-5. (in Chinese)
赵丹, 谢达平. 蓖麻毒蛋白研究进展. 粮食与油脂, 2005, (5):3-5.
- [2] Zeng YW, Song GQ, Peng YH, et al. A review of application and research progress in ricin. Subtrop Plant Sci, 2004, 33(1):60-63. (in Chinese)
曾佑炜, 宋光泉, 彭永宏, 等. 蓖麻毒蛋白研究及应用进展. 亚热带植物科学, 2004, 33(1):60-63.
- [3] Zheng C, Lei DZ, Lei Y, et al. Extraction the Ricin from the Castor Dregs. Guangdong Chem Ind, 2003, (5):1-4. (in Chinese)
郑成, 雷得柱, 雷雨, 等. 蓖麻毒蛋白提取. 广东化工, 2003, (5): 1-4.
- [4] Segel IH. Biochemical calculation. 2nd ed. Hoboken: John Wiley and Sons, 1976:333-336.
- [5] Chen NC. Pesticide biometric technology. Beijing: Beijing Agricultural

University Press, 1991. (in chinese)

陈年春. 农药生物测定技术. 北京: 北京农业大学出版社, 1991.

- [6] Editing Group of Industrial Toxicology Experimental Methods preparation of group. Industrial toxicology experimental methods.

Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979. (in Chinese)

《工业毒理学实验方法》编写组. 工业毒理学实验方法. 上海: 上海科技出版社, 1979.

Separation and purification of ricin and its killing effect on *Meloidogyne incognita*

JIN Ru-cheng, JIA Chao, YANG Xiao-hua, TAN Yu-ling, HOU Nan-nan

【Abstract】

Objective To study the killing effect of ricin on *Meloidogyne incognita*.

Methods Ricin seeds were shelled, de-fat, and stirred in phosphate buffer solution with ice bath for 2 h for extraction of Ricin. Ammonium sulfate was used to precipitate crude ricin protein, and saphdex G-200 column was used to separate and purify ricin. The concentrations of crude ricin protein and purified ricin were calculated respectively. Lobular plate method was applied to determined the killing effect of the ricin on South *Meloidogyne incognita*. The hemagglutination activity of the ricin was also detected.

Results By using Saphdex G-200 column, we found three fractions in the ricin. Fraction 2 is stronger than fraction1, and the killing rate of fraction 3 is low.

Conclusion Ricin can kill the the South *Meloidogyne incognita*, indicating that the substance can be used as a pesticide.

【Keywords】 Virulence; Hemagglutination tests; Lobular dish method

Author Affiliation: College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China

Corresponding Author: JIN Ru-cheng, Email: jinrucheng@lut.cn

www.cmbp.net.cn

Chin Med Biotechnol, 2008, 3(4):293-296

· 环球动态 ·

索拉非尼 (Sorafenib) 可提高晚期肝细胞肝癌患者生存期

索拉非尼 (Sorafenib/Nexavar) 是一种小分子、多靶向治疗药物, 具有抑制肿瘤细胞增生和血管生长的作用。临床前试验表明, Sorafenib 对人肝癌细胞系具有抗增殖作用。由此, 有研究者开展了 Sorafenib 治疗晚期肝细胞肝癌的大型随机、双盲、安慰剂对照的 III 期临床试验。该项研究结果发表在 2008 年 7 月 24 日出版的 *New England Journal of Medicine*。

该研究共招募了 602 例患者, 所有入组患者均经病理证实为肝细胞肝癌, 且未接受过系统治疗。患者被随机分为 Sorafenib 组 (400 mg, 每日 2 次口服) 和安慰剂组, 主要研究终点为总生存时间和无症状进展时间, 次要研究终点为影像学进展时间和药物安全性。

对于 321 例死亡事件的第 2 次中期分析显示, Sorafenib 组和对照组的中位总生存时间分别为 10.7 和 7.9 个月 (风险系数 0.69, 95% 可信区间 0.55 ~ 0.87, $P < 0.001$); 中位症状进展时间组间差异无统计学意义 (分别为 4.1 和 4.9 个月, $P < 0.77$); 中位影像学进展时间分别为 5.5 和 2.8 个月 ($P < 0.001$); 2 组均未发现完全不良反应, 而 Sorafenib 组有 7 例、对照组有 2 例患者被评价为部分不良反应, 其中, Sorafenib 组常见的不良反应有腹泻、体重减轻、手足皮肤反应和低磷血症等。试验结果表明单剂 Sorafenib 对晚期肝细胞肝癌的疗效明显优于对照组, 中位总生存时间和中位影像学进展时间与对照组相比均延长了近 3 个月, 因此该 III 期临床试验宣告提前终止。

晚期肝细胞肝癌的预后较差, 且一直缺乏比较有效的治疗手段, Sorafenib 的出现无疑为晚期肝细胞肝癌患者带来了福音, 而评估 Sorafenib 是否可用于肝癌局部治疗后的辅助治疗将成为下阶段的研究重点。

(郭春光, 柳青)