

责任编辑 徐 速
封面设计 本 忠
插 图 本 忠
责任校对 丁 文

蛇毒酶检测及纯化技术和应用

夏盛强 周新华 赵志信 李宗植 编著

辽宁大学出版社出版发行(沈阳市崇山西路3段4号)

朝阳新华印刷厂分厂印刷

开本: 850×1168¹/₃₂ 印张: 10.625 字数: 260千

1987年11月第1版 1987年11月第1次印刷

印数: 1—1,200

统一书号: 13429·028 定价: 元

ISBN 7-5610-0168-X/Q·7

前 言

人类从古代时起，就进行了探索蛇毒的奥秘。对蛇伤引起的组织肿胀、血凝失调和肌肉坏死等现象的研究与医治，已经积累了极为丰富的实践经验。

由于近代生物化学研究技术的迅速进步，为人们揭示蛇毒的本质及其作用机制，提供了有力条件。迄今为止，蛇毒被誉为自然界最集中的酶源之一，其中含有功能独特的酶、毒性蛋白质和活性短肽等。目前所知，从世界各类蛇毒中已经分离鉴定的酶竟达20余种。通过其分子结构与功能的研究以及毒理机制的了解，某些酶已成为分子生物学与生理学，在基础理论和应用研究上的重要工具。它们分别用于基因工程、临床诊断以及医治疾病的有效药物。

虽然我国对蛇毒在基础理论和实际应用研究上的某些方面，已经取得了显著进步，有的进入了国际蛇毒研究的先进行列。但就整体来看，我国幅员辽阔，蛇毒资源极其丰富，是一个亟待开发的酶类及药物宝库。不言而喻，我国的蛇毒研究与利用，正处在向纵深发展的新阶段。

为了满足从事蛇毒研究与利用的科技工作者和有关方面的需要，在当前国内尚缺少蛇毒研究技术专门书籍的情况下，我们汇集了国内外蛇毒研究方法与应用技术的文献资料，结合我们的研究和实践过程中的经验体会，编写成《蛇毒酶检测及纯化技术和应用》一书与读者见面，以期促进蛇毒研究和生产应用的发展，并在其中贡献一份力量。

本书共25万字，分为六章。第一章蛇毒的研究历史，着重介绍自古以来，国内外蛇毒研究各个阶段的进展和现代动向，

第二章蛇毒研究的基本技术，分别介绍各种电泳技术和各种类型层析技术，其中有凝胶过滤、离子交换层析、亲和层析和高液相色谱层析；第三章蛇毒蛋白质一级结构的测定，主要叙述蛋白质一级结构的研究程序、蛋白质和肽的氨基酸组成测定、蛋白质的特殊基团的测定以及肽末端测定。本章最后介绍肽链的折离、分离提纯和氨基酸排列顺序的测定；第四章蛇毒中酶的检测及分离纯化技术，其中列举了常见的十九种酶的检测与纯化方法以及酶的理化性质和生物学特性；第五章蛇毒其它蛋白组份的研究，阐述了蛇毒中的出血毒素、神经毒素、纤溶组份、舒缓激肽和降压因子的检测、分离纯化方法以及理化性质；第六章主要介绍蛇毒中酶和其它蛋白组份的基础理论研究和临床应用。本书最后附有较多的国内外参考文献。因此，本书可作为高等学校和研究机构从事蛇毒研究的科技人员参考，也可为医疗和制药等领域科研或生产技术骨干提供各种有用的实验研究方法。

本书编写过程中，由邹本忠同志精心绘制了大量图表，值此本书出版之际，谨致以深切谢意！

由于我们水平所限，书中肯定存在不少缺点和错误，诚恳地希望读者批评指正。

编著者

1987年10月28日

目 录

第一章 蛇毒研究的历史	1
第一节 人类对蛇毒研究的贡献	1
一、关于蛇毒毒理方面的研究	2
二、蛇毒化学的研究	3
三、蛇毒生理学方面的研究	4
四、蛇毒血液学方面的研究	5
五、蛇毒免疫学方面的研究	9
第二节 近代蛇毒研究的进展	9
一、近年来蛇毒酶研究进展	10
二、蛇毒药理学和毒理学方面的研究	16
三、蛇毒的利用	20
第二章 蛇毒研究的基本技术	23
第一节 电泳技术	23
一、聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳分离蛋白质的原理	24
二、聚丙烯酰胺凝胶电泳的性能及制备	30
三、蛇毒成分的聚丙烯酰胺凝胶电泳	46
四、SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳	47
五、等电聚焦技术	56
第二节 分子筛层析(胶过滤)技术	69
一、分子筛层析技术的原理	76
二、分子筛层析技术在蛇毒酶分离中的应用	83
第三节 离子交换层析	86
一、离子交换层析的基本原理	86
二、离子交换剂的类型	87
第四节 亲和层析法	103

一、亲和层析的基本原理	103
二、亲和层析的制备过程	104
三、亲和层析法的操作步骤	106
四、亲和层析法在蛇毒酶分离中的应用	108
第五节 高效液相色谱层析法	109
一、基本原理	109
二、高效液相层析仪概述	111
三、高效液相层析的固定相填料	112
四、色谱层析方法的选择	113
五、分离度的调整	114
六、操作步骤	116
第三章 蛇毒蛋白质一级结构的测定	120
第一节 蛋白质一级结构的研究程序	120
一、蛋白质制剂必需是高纯度	120
二、活性蛋白质含有肽链数目及大小	121
第二节 蛋白质和肽的氨基酸组成测定	122
一、蛋白质水解	122
二、氨基酸的定性分析	122
三、氨基酸的柱层析定量测定	124
第三节 蛋白质中特殊基团的测定	124
一、色氨酸的测定	126
二、巯基的测定	126
三、二硫键的测定	127
四、氨基和酰胺基的测定	128
第四节 蛋白质和肽的末端测定	129
一、N-末端的测定	130
二、C-末端的测定	132
第五节 肽链的拆离和分离提纯	134
一、肽链的拆离	134
二、二硫键的拆开	135
三、肽链的鉴定及分离	135

第六节 肽链的部分裂解及肽片断的分离	135
一、肽链的部分裂解	135
二、肽片段的分离	138
第七节 肽段氨基酸排列顺序的测定	139
一、Edman降解法	139
二、DABITC/pITC双偶合法	141
三、酶降解法	147
第八节 肽链的一级结构复现	147
一、重迭肽	148
二、二硫键的定位	148
三、酰胺基的定位	149
第九节 蛇毒蛋白质一级结构的测定	149
一、蛇毒磷脂酶A ₂ 的一级结构测定	150
二、蛇毒蛋白毒素的一级结构测定	153
第四章 蛇毒酶的检测及分离纯化技术	154
第一节 蛇毒中酶的分布	154
第二节 蛇毒中一些酶的性质	157
第三节 蛇毒酶的检测、分离、纯化 及其作用机制	158
一、氧化还原酶类	158
二、作用于磷酸酯的酶类	171
三、作用于糖基化合物的酶	194
四、作用于肽键的酶	202
五、作用于羧酯键的酶	248
六、作用于芳酰胺的酶	288
第五章 蛇毒其它蛋白组份的研究	290
第一节 纤维蛋白溶解组份 (纤溶组份)	290
第二节 出血毒素	295
第三节 神经毒素	299
第四节 抗凝血组份	300

第五节	蛇毒降压因子	303
第六节	舒缓激肽增强肽	303
第七节	膜活性多肽	309
第六章	蛇毒的应用	311
第一节	蛇毒中酶的应用	311
一、	在基础理论研究中的应用	311
二、	蛇毒酶在临床上的应用	313
第二节	蛇毒其它蛋白组份的应用	313
一、	在基础理论研究中的应用	319
二、	在临床中的应用	319
	参考文献	320

第一章 蛇毒研究的历史

在古代，由于生产水平和科学技术，处在很不发达阶段，人们对蛇类的认识，常常陷于迷信观念之中。较典型的有：埃及人认为蛇是超脱大自然的永存者。即使古希腊的文明盛世，那里的人们常把蛇当作智慧女神的象征，认为它体现着天地的精华，富饶健康而永续长生。由于蛇一年之内脱皮数次，把这种周期性的更新，看成是长生不老的现象。当时，就连生病的患者渴望得到痊愈，都要聚集到庙寺虔诚谩拜，乞求蛇神的恩赐和保佑。因此蛇类受到人们的精心维护。

在非洲和印度，一些人把蛇崇拜到和宗教同等并立的位置，因而印度的某些地方对蛇的崇拜沿续至今。而欧洲的情况有所不同，一些基督教的信仰者，认为蛇是妖魔蜕变而来的，因此受到上帝的惩罚，从“人类始祖的乐园”被驱逐到土里爬行，蛇毒也就随之产生出来。从此，蛇就遭到人们的唾弃和厌恶。

如上所述，古代的埃及、希腊、非洲、印度与欧洲，人们对蛇类的认识，存在两种截然不同的观点，但是，无论哪种说法都没能摆脱迷信观念的束缚。由于当时生产力所限，还谈不上科学发展，因而没有形成科学的认识论和方法论。人类对自然界绚丽多彩的生命现象还不能给予科学的解释。正因如此，它却给后来人提出了一系列需要思索的问题，进而激励人们为之不断地探索揭开蛇毒之谜。

第一节 人类对蛇毒研究的贡献

随着社会的发展，生产力水平的不断提高，人们对自然界

逐步有了认识，公元前四世纪，亚里士多德，在他的“动物史”一书中叙述蛇的分类法。公元前一百年Pliny为之写了一个注解Avicenne又细致的论述过蛇毒中毒后的症状。然而，公元前二百年北非迦太基的Hannibal（汉纳拜尔）就利用毒蛇的特性以蛇作为一种进攻性武器，装在陶器罐里扔在罗马人的战船上使水手们遭到惊吓而逃跑。

我国在毒蛇类认识方面比较早，在唐代，柳宗元（773—819年）在其“捕蛇者说”一文中就对五步蛇作了生动描述，知道这种蛇啮人，无御之者”可以已大风，挛腕，痿痹去死肌，杀三虫”。此后，历代本草对它均有记述。宋朝的李昉（925—996年）在所著之《开宝本草》（973年）中说：这种蛇产于南方及蜀部诸山中，九、十月采捕，以火烘干作药用，到了明朝李时珍（1518—1593）的巨著《本草纲目》（1578）问世，对五步蛇的形态，产地，用途等，就有更详尽的记载。

国外对五步蛇的认识远较我国为晚。直到1888年Guenther才根据从长江中游地区获得的五步蛇标本加以描述，作为新种发表，定名为Halys acutus。较柳宗元晚一千多年，较李时珍晚近三百年。

一、关于蛇毒毒理方面的研究

十六世纪初期，Van Helmont提出了炎症理论，1648年，在他死后发表了“Orthus Medicinae”一书，他认为当蛇咬人时，蛇排出“使人发炎的烈酒”——蛇毒是冷的，它使血管中的血液凝固，阻止血液循环，1685年Moise Charas制备了带有金黄色标志的Theriaque还生产出Orvietan和含有蛇肝粉和蛇脂肪的“Bejoard”后来Redi根据观察到的事例明确地说明，毒蛇由牙齿中排出毒液，死蛇或活蛇都引起致命伤害。以后不到一个世纪他的观察就由Fontana（1781年）发表的著名著作中加以肯定。

1758年林纳Linnaeus确定了蛇的分类地位，从林纳到十九世纪初，不同种类的蛇包括蜥蜴在内，都归在一个不同族的群体内。1830年Walger把不适当的族从蛇类中分出去。Dumeril和Bilron 1854年提出按蛇的牙齿结构分类。1855年Lacepede写了蛇的自然史。

二、蛇毒化学的研究

十八世纪末，化学已发展成为一门实验科学。十九世纪在Claude Bernard的影响之下，生理科学有很大发展，了解了结构、功能，和“内环境”对解释维持生命基本条件体系的相互关系。在无机化学发展的基础上，又逐步地发展了生物化学这门年轻的科学。因此化学家们首先对蛇毒感兴趣，设法去解释蛇毒的成分，利用蛇毒和一般试剂反应，再提取有毒的组份，观察到某些试剂破坏蛇毒，而另一些试剂使有毒成分沉淀。1843年Lucien Bonaparte用乙醇然后用乙醚沉淀*Vipera berus*（极北蝰）蛇毒获得了一种称为“Viperine”的毒蛇粉。并把Viperine比喻为消化酶（酵素）。几年以后，美国Mitchell用沸水然后用乙醇处理*Crotalus*响尾蛇毒，经干燥得到干粉，再用动物测其毒性，命名为“Crotaline”，响尾蛇毒粉。

1878年Pelder提出蛇毒是一类蛋白质样物质，这便使蛇毒研究取得新发展，不久他与Reichert（1883年1886年）合作进一步证实Crotaline不是一个单一的物质。他们通过半透膜的透析，将*Crotalus adamanteus*（东部菱斑响尾蛇）蛇毒分离成蛋白胨蛇毒和球蛋白蛇毒，将蛇毒煮沸后，提取出一种象白蛋白一样的沉淀物质。与此同时Wolfenden（1881年）进一步支持蛇毒是类蛋白质样物质的假说。进而否定了Gauthier曾于1881年关于蛇毒是生物碱物质和Blyth（1877年）关于蛇毒是以眼镜蛇酸（Cobric acid）形式存在的结论。

Wolfenden（1886年）和Kanthaek（1892年）声称Pelder

和Reichert分离的蛋白胍蛇毒是一种胍。后来Martin和Smith (1892年) 也认为印度的眼镜蛇毒和澳大利亚的*Pseudechis Porphyriacus*伊澳蛇(眼镜蛇亚科)的有毒成分也属于胍类。Faust (1907年) 的观点使上述的不同意见趋向平息, 不过, 他又把Ophiotoxin (蛇毒素) 这个术语加到原先蛇毒提取物的名字表前。在把印度眼镜蛇毒溶液加热后, Faust用酸水处理加热后获得的沉淀, 得到Ophiotoxin蛇毒粉, 进行分析, 并确定它的成分为 $C_{17}H_{26}O_{10}$, 因而把蛇毒当作为Sapotoxins (皂毒苷) 类的物质。

在以后的二十五年期间, 蛇毒类化学性质的知识, 没有太大的进展, 不过, 在1893年Martin报导了一个重要的发现, 在50大气压下利用一个过滤器, 把*Pseudechis Porphyriacus*伊澳蛇蛇毒分离成为二个组份, 一个组份是当注射到动物体内后使之出血; 而另一组份是抑制呼吸。

三、蛇毒生理学方面的研究

十九世纪以来, 由于生理学的介入, 实验技术有了很大发展。1860年Mitchell观察*Crotalus*响尾蛇对蛙和兔的咬伤情况, 报导说这些爬行动物的毒素是以麻痹为特征的。1886年Reichert完成一系列实验后, 发表他的著作中断定*Crotalus adamantes*东部菱斑响尾蛇, *Agkistrodon Piscivorus*食鱼蝮蛇和*Naja tripudians*金黄眼睛蛇的毒素是刺激神经末梢和抑制中枢神经的。可是Fayrer (1868——1869) 却表示一个不同的观点, 他记述动物一旦被眼睛蛇咬伤就引起麻痹和窒息, 他和Brunton (Brunton and Fayrer 1874年) 共同研究后, 把这种现象解释为是由于运动神经麻痹跟着发生运动终盘的损伤而引起的, 并且认为这种损伤和Claude Bernard记述过的箭毒引起损伤的作用机制相似。1883年Wall, 1890年Ragotzi又进一步证实了Brunton和Fayrer在1874年观察到的结果, Ragotzi详

细说明了那是因为膈神经末梢迅速受到眼镜蛇毒影响的缘故。

Elliot等人(1905年)也在这方面有所建树,他们证实*Bungarus Caeruleus*印度环蛇蛇毒引起的麻痹和箭毒引起的动物麻痹一样认为蛇毒还影响人的呼吸中枢。与此同时,Fraser和Elliot(1905年)报导,*Hydrophiidae*(海蛇亚科)毒素使神经肌肉接头麻痹。证实Ragotzi早些时候发现的这种选择性地使肌肉麻痹是由膈神经决定的。

十九世纪末期,知道了*Elapidae*蝮蛇亚科和*Hydrophiidae*海蛇亚科蛇毒中,存在一种有作用的毒素。因此,人们的注意力就转向蛇毒中毒的其它症状上。然而蛇毒引起的呼吸作用麻痹,是部分地受中枢神经系统的影响(Rogers1904年;Elliot1905年;Fraser和Gunn1909年Acton和Knowles1921年;Epstein1930;Chopra和Iswariah1937, Venkatachalam和Ratnagiriswaran1934年)还是完全受外周神经系统影响(Arthus1910年;Cushny和Yagi1918年;Kellaway等;Kellaway1937年)的问题仍然存在着争论。

对蛇伤的长期诊察也鼓舞着生理学家更多地在动物身上进行反复实验,周密地研究和推断蛇毒对人体的效应,考虑这些效应是由于一种或几种机能改变引起的结果。

四、蛇毒血液学方面的研究

早在1737年Geoffroy和Hunault曾经观察到被毒蛇咬伤的猫和狗的血液是不凝固的。相反1787年Fontana用少量同样的蛇毒注射到兔颈静脉内,引起立即死亡,打开兔子的血管却发现其血凝固了。

十九世纪末Phisalix(1899年)记述到蝮蛇毒具有两种活性,低剂量时具有抗凝血活性,而高剂量时是凝血活性。

1854年美国Brainard注意到响尾蛇(毒蛇)咬伤后死去的动物血是不凝固的。1860年Mitchell也观察到*Crotalus ada-*

*manteus*东部菱斑响尾蛇的毒液能阻止体外正常血液凝固。关于这个问题也发表了不同的观察结果,1893年Martin的实验结果报导了眼镜蛇亚科的某些蛇毒,例如*Pseudechis Porphyriacus*伊澳蛇和*Notechis Seutatus*虎蛇,当实验动物注射高剂量蛇毒时,使血管中血液凝固,低剂量时血液不凝,相比之下,用印度眼镜蛇做的实验,在任何剂量下,体内和体外的血液都不凝结(Cumiugham 1895年; Stepbus和Myers 1895年; Rogers 1904年)。1901—1903年Lamb试图按照蛇毒对血浆的作用来分类,继而是Noc (1904年) Lamb认为,作为凝血剂的蛇毒有Viperidae蝰蛇亚科中包括*Vipera russellii* (园斑蝰蛇)和Elapidae;眼镜蛇亚科的*Pseudechis Porphyriacus* (伊澳蛇);澳大利亚的*Acanthophis antarcticus* (棘蛇)。

Lamb (1901年) 记载的重要一点是*russellii*园斑蝰蛇蛇毒,能将用柠檬酸盐处理过的本身不会自身凝结的血浆发生凝结。Noc也证实这些发现,并观察到亚洲和非洲的蛇毒,阻止按一定比例加入CaCl₂的柠檬酸盐处理过的血浆的凝结。1904年,1905年, Morawitz在他的基础研究中解释了血液凝固现象的基本机制,他的理论后来被进一步证实,那就是血液凝固的基本因素,是纤维蛋白原转变成纤维蛋白,进而形成血块,血清的凝血酶原和来源血小板的凝血激酶作用形成凝血酶,凝血酶就是作用于纤维蛋白原的因子。1904年Noc设想引起血液凝结的蛇毒,使血液中形成一种有活性的凝血酶,但是,他不排除这种可能性,即这些蛇毒实际上可能预先含有凝血酶。1912年Arthus和他的同事Stawska (1910年),根据他们的工作指出:响尾蛇亚科的蛇毒起的作用正如它们含有一种凝血酶一样,而*Russellii* (园斑蝰)蛇毒是加速凝血酶原向凝血酶的转化。1905年Martin, Houssay 和一起工作的Sordelli和Negrete (1918年, 1919年),都证明蛇毒中使血液凝固的因子不能通

过半透膜。

1898年Mitchell和Stewara, 1904年Noc曾经认为: 蛇毒的抗凝作用, 是由于纤维蛋白被“酵素”溶解促使红细胞和血管内皮中的纤维蛋白原沉淀(Houssay和Sordelli 1918年)或者由于抗激酶的作用而引起的。(Morawitz 1904年)

蛇毒凝血现象创造性的观察, 引出了一个假设: 蛇毒是含有“酵素”或者是1833年Payen和Persoz发现的, 早已讨论过的和淀粉酶有类似的原理。

早在1843年Lucien Bonaparte已经证实了“蛇毒和酶”之间的相互关系。十七年以后, Mitchell把从响尾蛇亚科蛇毒中提取的与胃蛋白酶、唾液淀粉酶有关的物质, 认作是“Crota-ine”(响尾蛇毒粉); 1867——1869年Viaud Grand—Marais认为眼镜蛇毒具有“酵素”的性质, 是由“Nagine”引起的。1881年De Lacerda使用*Bathrops*(矛头蝮)蛇毒使牛奶凝聚, 并能溶解纤维蛋白和卵蛋白。1897年Phisalix证实, 蝰蛇毒的一种成分“《Echidnase》蛇毒致炎酶”, 具有和淀粉酶同样的方式进行消化组织的能力。Flexner和Noguchi(1902年)观察到眼镜蛇毒有改变蛋白质的能力, Noc 1904年把这些现象归因于蛋白质水解作用。并认为眼镜蛇的蛇毒, 有很强的蛋白水解作用, 而蝰蛇蛇毒只有微弱的蛋白水解能力。1912年Delezenne和Ledebt提到*Lachesis*巨蝮蛇蛇毒含有使胰液活化的激酶, 1919年Mocel在实验中观察到, 蛇毒能够引起核酸的催化分解。

Mitchell 1860——1868年; Mitchell和Reichert 1883——1886年认为响尾蛇毒引起出血, 是由于在加热和酒精提取时, 容易破坏“出血物质”的含量引起的。他们注意到这些引起“出血的物质”不能穿过透析膜。他们的观察, 后被Flexner和Noguchi 1902年进一步证实。

1884年De Lacerda发现, 当*Lachesis*巨蝮蛇蛇毒加入红

细胞中时，细胞被破坏，甚至成了碎片。Mitchell 1868年，Reichert 1883——1886年，Stewart 1898年研究了 *Crotalus adamantes* (东部菱斑响尾蛇) 蛇毒的性质，进一步确认了 De Lacerda 观察的结果。1888年 Feohistow 论述红细胞在 *Viper* (蝰蛇) 或 *Crotal* (响尾蛇) 蛇毒溶液中的细胞溶解现象。1890年 Ragotzi 用蛇毒处理蛙红细胞，使血红蛋白散出。1893年 Martin 也得到了同样的结果。

大约在1898年，Myers 在体外把少量的马血清加到非溶解剂量的眼镜蛇毒中，能引起红细胞的溶解。同时，他区分了眼镜蛇毒的细胞溶素和眼镜蛇神经剂的差异，认为，细胞溶素是对细胞溶血起主要作用的。1902年 Flexner 和 Noguchi 获得一个重要的观察结果：缺乏血清的红细胞不会被蛇毒溶血，但是把少量新鲜血清加到已加蛇毒的细胞中，溶血就发生了。几年以前 Bordet 1899年，1901年 Ehrlich 和 Morgenroth 1900年，已经观察到对免疫血清的溶血现象起主要作用的一种物质，并称为“*Seric alexine*” 保养防御素或补体的物质。1902年，1903年 Kyes 提出对溶血现象起主要作用的原因，是血清卵磷脂转变成卵磷脂毒。Dungern 和 CoCa (1907, 1908年) 分别发现抗蛇毒血清对卵磷脂毒不起作用，卵磷脂毒不是卵磷脂和蛇毒的简单结合产物。并提出蛇毒中含有使卵磷脂的油酸裂解的脂酶，产生了溶血性的物质。后来，Delezene 和 Ledet (1911年 1912年) 证实，蛇毒淀粉酶在一定条件下，把卵黄或血清的卵磷脂转变成溶血卵磷脂。

二十世纪初，关于蛇毒的性质，能根据它们含有各种各样蛋白质样物质而彼此分开，某些是毒素，其余的可以比作“酶或淀粉酶”。这些研究成果鼓舞着 Arthus (1912年)，去设想根据中毒引起的主要症状，提出这些物质的生理学分类方法。他规定 *Naja Tripudians* (金黄眼镜蛇) *Crotalus adamanteus* (东部菱斑响尾蛇) 和 *Vipera russellii* (圆斑蝰蛇)

蛇毒分别代表蛇毒的箭毒，抑制和凝血类型。根据这个观察结果可以将不同蛇毒分成三种基本的组份。

五、蛇毒免疫学方面的研究

1887年美国的Sewall观察，用非致死剂量的*Crotalidae*响尾蛇科的蛇毒，注射鸽子。注射几个星期后，获得了抵抗致死剂量的响尾蛇毒的能力。

不久Behring和Kitastatoc(1890年)、Phisalix和Bertrand(1894年)都分别发现了抗毒素。1894年Calmette给豚鼠和兔子注射非致死剂量的蝰蛇和眼镜蛇毒，发现这些动物的血清获得中和这些毒素的性质。后来Calmette1896年建立了抗毒血清疗法的基本原则。1924年Ramon用福尔马林处理蝰蛇毒，它的免疫力没有破坏，而抑制了它的毒性，这样使蛇毒的研究领域达到一个新的阶段。

生物化学、生理学、药理学和免疫学，在二十世纪取得迅速发展、丰富了我们关于蛇毒的组成，它们的成分结构，以及它们引起器官功能障碍方面的知识。使我们了解在特定的条件下，蛇为了保护生命而引起攻击的反应机制。

近二十年来国际蛇毒研究的发展十分迅速，每年有大量的研究论文发表于毒物学、生物化学、药理学和毒理学等各类专门刊物。对很多种蛇毒的性质、组成和结构有了深入的研究，对蛇伤防治和在临床应用上也有了大量的报导。

第二节 近代蛇毒研究的进展

自从六十年代中期，日本、瑞典和我国台湾地区的有关实验室，应用离子交换柱层析电泳技术、氨基酸自动分析仪、顺序分析仪、质谱、X衍射等一系列新的生化研究技术，从蛇毒中获得了神经毒素。近二十年蛇毒的研究取得了迅速的发展。迄

今为止，已经完成一百多种蛇毒蛋白的一级结构测定。有关蛇毒对神经，肌肉、血液系统的作用等方面的研究，步步深入。促进了生物化学、生物物理，生理、药理、毒理和医学等方面许多工作的发展。如蛇毒对血液系统作用的研究，不仅导致了舒缓激肽的发现，也帮助了血液凝固瀑布学说的建立。

眼镜蛇神经毒素和 α -银环蛇毒素的分离成功，并以之作为一种特殊的标记物加以应用，大大促进了乙酰胆碱能受体结构与功能的研究。此外，蛇毒及蛋白组份作为研究工具，还广泛地用于生命科学研究和临床诊断。在我国蛇毒精氨酸脂酶治疗血管栓塞性疾病方面，取得了可喜的成果。

一、近年来蛇毒酶研究进展

由于生物化学的进步，蛇毒酶的研究进展十分迅速，迄今为止，已在各类蛇毒中找到了近三十种酶。

(一) 蛇毒酶的分离纯化

自从1938年Slotta和Fraenkel-Conrat，首次从南美响尾蛇恐怖亚种蛇毒中，成功地分离出一个结晶蛋白“Crotoxin”以来，近几十年随着蛋白质分离纯化技术的发展，已有许多蛇毒酶被高度纯化。

现今，蛇毒酶分离纯化的主要手段，是凝胶过滤和离子交换层析。凝胶过滤法是利用被分离物质的分子大小不同而将其分开。由于它快速、简便、重复性好，洗脱条件非常温和，在整个分离过程中几乎不会使酶分子变性和失活。一般说来，被分离的物质可以接近全部回收，因而，被广泛采用。

凝胶过滤的载体多采用葡聚糖凝胶，如Sephadex G-75和Sephadex G-100，Sephadex G-200等。此外还有采用聚丙烯酰胺凝胶（Bio-Gel p）和琼脂糖凝胶（Sephrose和Bio-Gel A）。载体的型号很多，应该考虑到酶分子的大小特性来选择使用。