

短尾蝮新突触前毒素和细胞毒素的纯化 及部分序列*

吉永华 陆丽芳 徐 科

(中国科学院上海生理研究所, 上海 200031)

服部 宏之 寺川 进

(日本冈崎国立生理学研究所, 冈崎 444)

摘 要

用反相高效液相色谱技术对中国产短尾蝮蛇(*Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*)毒中的毒性蛋白重新进行了纯化, 结果从中获得了 3 个由约 122 个氨基酸残基构成的毒蛋白(AgTx-1, AgTx-2 和 AgTx-3). 三者对小鼠的 LD_{50} 分别为 0.075, 0.51 和 6.6mg/kg. 在小鸡颈二腹肌标本上的毒理分析表明, AgTx-1 和 AgTx-2 均在阻遏接头传递之后, 亦不影响肌肉对乙酰胆碱的敏感性. 在 AgTx-3 的作用下, 标本的间接收缩则由于舒张不全而逐渐变小, 最后停止在挛缩状态. 部分氨基酸序列测定结果又表明, AgTx-1 和 AgTx-2 的 N-端 32 肽序列完全相同. 考虑到 AgTx-1 的 LD_{50} 在粗毒中的含量及其序列等均与前文报道的 β -AgTx 极为相似^[1], 故我们认定它们为同一毒素, 并定名为 β_1 -AgTx. 而 AgTx-2 则应是新的突触前毒素, 相应地定名为 β_2 -AgTx, 至于 AgTx-3 便是新发现的细胞毒素.

关键词 蝮蛇毒、突触前毒素、细胞毒素

徐科等人曾在生理学观察的基础上得出结论, 认为在我国江浙一带产日本短尾蝮(*Agkistrodon blomhoffii brevicaudus*, 旧称 *Agkistrodon halys Pallas*)的毒液中虽既含出血毒素, 也含神经毒素, 但受该毒蛇咬伤时的主要致死因子不是其中的出血毒素, 而是神经毒素^[2]. 接着他们又用常规生化分离技术首次从该毒液中分离得到了 1 个后来被命名为 β -Agkistrodotoxin (β -AgTx) 的突触前毒素^[3, 4]. 有关该毒素的神经毒理作用, 理化性质以及其分子结构特征等研究结果已有较为详细的综述^[5]. 本文将报道, 改用反相高效液相色谱技术对该短尾蝮蛇毒重新进行了分离与纯化, 又从中得到了 1 个与前文报道的 β -AgTx 相同的突触前毒素, 即 β_1 -AgTx (本文中描述为 AgTx-1) 和另一个结构同源但毒性较弱近 10 倍的新的突触前毒素, 即 β_2 -AgTx

1993-01-14 收稿, 1993-05-19 收修改稿.

* 本工作得到日本文部省国际合作项目的部分资助.

(AgTx-2), 以及一个细胞毒素, 即 AgTx-3.

1 材 料 与 方 法

1.1 粗毒的分离

日本短尾蝮亚种蛇粗毒购自江苏常州个体蛇养殖场. 粗毒的初分离分两步进行, 首先取约 825mg 粗毒溶解在 10ml 的 10% 醋酸水溶液中, 再上到经此醋酸水溶液平衡的 Sephadex G-25 凝胶柱 (3×95cm) 进行层析过滤, 收集各峰进行毒性鉴定后冷冻干燥. 第二步将毒性组分 (约 750mg) 仍用 10ml 的 10% 醋酸水溶液溶解, 并在 4°C 条件下, 离心 (10000 r/min) 10 min, 取上清液直接装填在另一根 Sephadex G-50 凝胶柱 (3×100cm) 上, 再次进行层析分离, 鉴定各组分的毒性, 冷冻干燥, 放置在低温冰箱内备用.

1.2 毒素的纯化

取约 2.5mg 上述毒性组分, 溶解于 40μl 0.15mol/L 甲酸铵 (pH 2.70) 溶液, 然后注入 BHB-II 型 HPLC 系统 (中国科学院大连化学物理研究所仪器厂产品), 用 YWG-CH C₁₈ (0.5×20cm) 柱进行反相溶剂梯度分离. 采用的洗脱流动相参照文献[6]. 溶剂 A 为 0.15mol/L (pH 2.70) 甲酸铵溶液, 溶剂 B 为光谱纯乙腈 (中国科学院上海脑研究所产品). 收集各毒性组分并加以冷冻干燥后, 再用上述相同的柱和 HPLC 系统, 但以不同的洗脱梯度条件再次进行分离 (每次进样量约 1mg/40μl 溶剂 A), 收集并冷冻干燥各毒素蛋白成分. 再先将它们分别用 5% 的醋酸水溶液溶解并用 Sephadex G-25 凝胶柱 (1.5×70cm 或 1×40cm, 柱子的平衡和洗脱液均为 5% 的醋酸水溶液) 过滤脱盐, 冷冻干燥. 最后用 CM Sephadex C-50 离子交换柱 (2×50cm) 分别将各毒素蛋白再次进行纯化, 用起始离子强度为 0.01mol/L 或 0.02mol/L 逐渐增至 0.75mol/L 的醋酸铵溶液进行阶梯式洗脱. 被纯化的各毒素蛋白再分别经上述相同条件的 Sephadex G-25 凝胶柱的过滤脱盐, 冷冻干燥制成干粉后, 放置在低温冰箱内以备分析用.

1.3 毒性检测与电泳鉴定

称取蝮蛇粗毒和各柱层析组分约 1mg 溶解在生理盐水中, 将不同剂量样品的生理溶液 0.2ml 并注入小鼠的腹腔内. 每一剂量组用 3 只小鼠, 但当统计小鼠的半致死量 LD₅₀ 时, 每组一般用 5 只小鼠. 观察注射 24h 的小鼠的死亡情况, 计算小鼠的 LD₅₀ 以及致死比效 (Sepecific lethal Potency; SLP; 总 LD₅₀ 值/总 280nm 吸收值). 同时打开小鼠腹腔, 观察腹膜上有无出血斑, 作为出血毒素的测检指标. 电泳鉴定方法参照文献[7], 采用中性磷酸缓冲液, SDS-聚丙烯酰胺凝胶板电泳系统. 用于分子量测定的 myoglobin 标准肽段样品试剂盒为瑞典 Pharmacia 公司产品 (Lot. No. 2052).

1.4 乙酰胆碱敏感性的测定

参照文献[8], 按 Ginsborg 等所描述的方法制备出壳后 3—7 天内的小鸡颈二腹肌标本, 比较在溶液中加毒前以及加毒并引起了接头传递完全阻遏后, 乙酰胆碱所引起的标本肌肉收缩幅度.

1.5 氨基酸组成及序列测定

氨基酸组成分析及序列测定分别是在日本日立公司的氨基酸分析仪 (Model 835) 和美国应用生物系统公司的蛋白质顺序仪 (Model 470A) 上进行的. 样品的水解, 分析及序列的自动测定方法均参见文献[9].

2 结 果

2.1 粗毒的凝胶柱层析分离

经鉴定, 本工作中所用的日本短尾蝮亚种蛇粗毒的 LD_{50} 约 1.25 mg/kg 体重, SLP 约为 33.3. 如 Sephadex G-25 凝胶层析图谱(图 1(a)) 所示, 粗毒可被分成 2 个峰. 毒性组分集中在峰 S_1 中, 其 SLP 为 49, 但峰 S_2 对小鼠却无毒性作用, SLP 小于 1.22. 峰 S_1 再经 Sephadex G-50 柱层析后, 被分离成 4 个峰(图 1(b) 的峰 F. I 至 F. IV). 毒性鉴定表明, 只有 FIII 的 LD_{50} 提高至 0.75 mg/kg 体重, SLP 为 52 左右, 而其余各峰的 LD_{50} 均大于 5 mg/kg 体重, 其 SLP 均低于 10. 在上述毒性鉴定中, 除粗毒外, 均未观察到小鼠腹腔有出血现象.

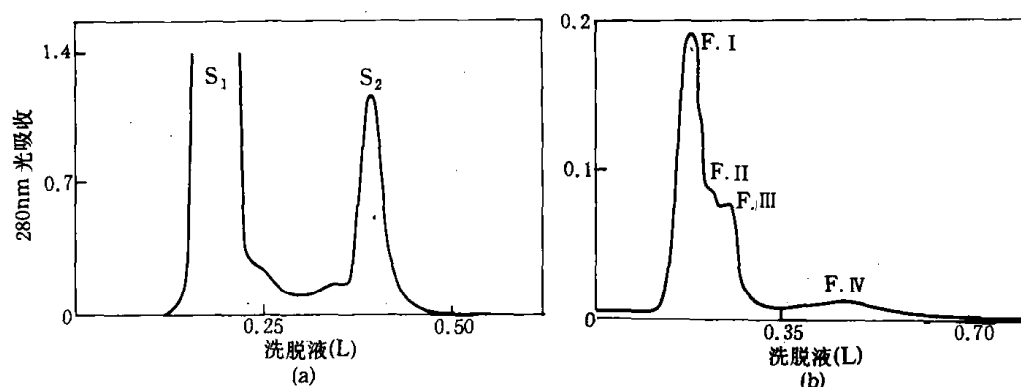


图 1 短尾蝮蛇粗毒的凝胶层析柱初步分离图谱

(a) 和 (b) 分别为 Sephadex G-25 和 Sephadex G-50 凝胶柱所得的图谱, 柱子的平衡和洗脱液均为 10% 的醋酸水溶液; 流速: (a) 和 (b) 分别为 30 和 40 ml/h, 部分收集: (a) 和 (b) 分别为 5 和 7 ml/管

2.2 毒素的 HPLC 与离子交换柱的纯化

上述 F. III 毒性组分经反相 HPLC 又被分成 5 个蛋白组分(图 2(a)). 组分 F. III-3 的 LD_{50} 提高至 0.15 mg/kg 体重, SLP 也相应地增高至 260, 而组分 F. III-1, F. III-2 和 F. III-5 的 LD_{50} 却分别为大于 4.0, 58 和 2.2 mg/kg 体重, 它们的 SLP 也分别相应地降至小于 9.88, 6.73 和 17.87. 毒性组分 F. III-3 再经反相 HPLC 分离后, 得到了 3 个毒素蛋白(见图 2(b)). F. III-3-1, F. III-3-2 和 F. III-3-3 对小鼠的 LD_{50} 分别为 0.095, 0.888 和 1.25 mg/kg 体重. 至于它们的 SLP, 则 F. III-3-1 的增高至 400, F. III-3-2 的略高于粗毒的水平为 37, 而 F. III-3-3 的却降为 22.2. 这 3 个

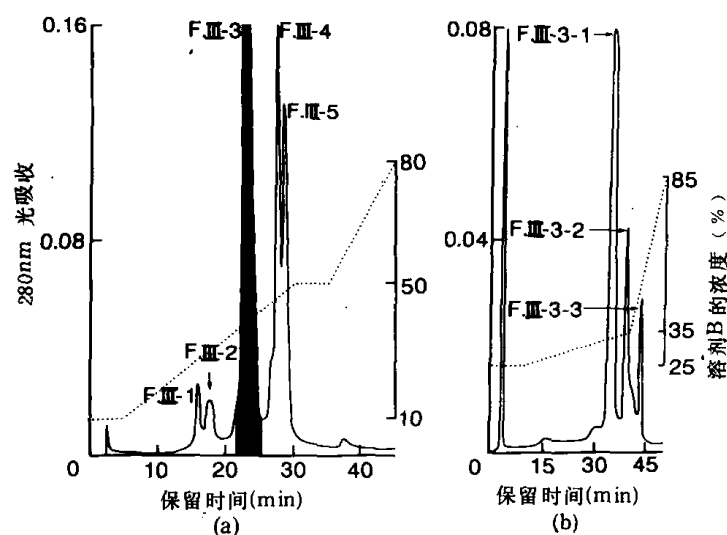


图 2 短尾蝮蛇毒素的 HPLC 分离图谱

(a) 为图 1(b) 中毒性组分 F. III 的分离, (b) 为从 F. III 中分离的毒性组分 F. III-3 (即左图谱中涂黑部分) 的进一步分离

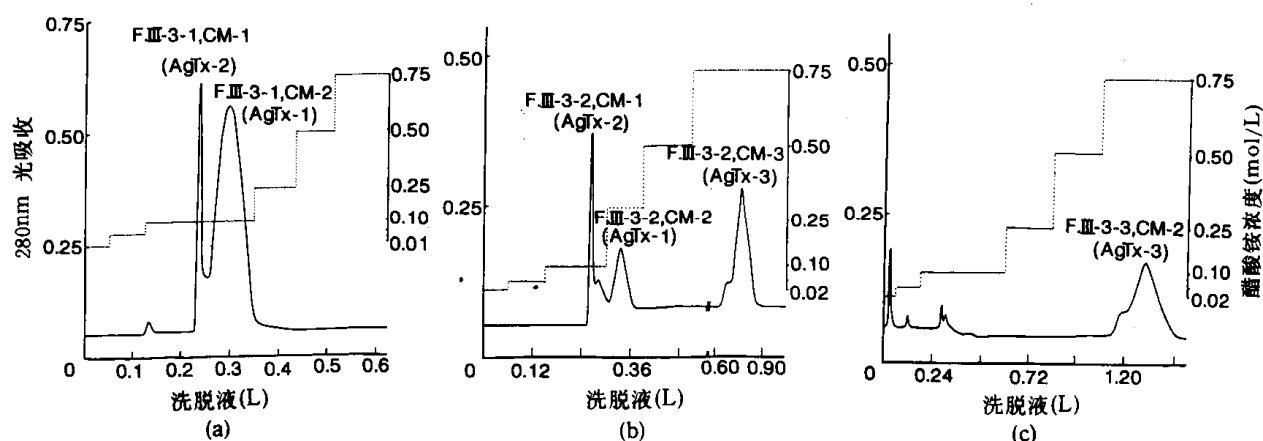


图 3 短尾蝎蛇毒素的 CM-Sephadex C-50 离子交换柱的纯化图谱

(a), (b) 和 (c) 分别为毒素组分 F. III-3-1, F. III-3-2 和 F. III-3-3 的纯化, 上样量分别为 50, 20 和 10mg/ml 的 1% 醋酸溶液, 流速分别为 30, 36 和 26ml/h

毒素蛋白在 CM Sephadex C-50 离子交换柱上的纯化图谱示于图 3(a), (b), (c), 分别用 AgTx-1, AgTx-2 和 AgTx-3 表示. 经毒性的最后鉴定, AgTx-1, AgTx-2 和 AgTx-3 对小鼠的 LD_{50} 分别为 0.075, 0.51 和 6.6mg/ml 体重, 三者的 SLP 分别为 666.7, 90.89 和 5.0 需要提出的是, 图 2(a) 中的组分 F. III-4 也给出了 LD_{50} 为 0.685mg/kg 体重的毒性作用, 但当用反相 HPLC 对该组分再进行分离时发现, 其主要成分并无毒性 (LD_{50} 大于 9.6mg), 因而该组分的毒性效应是由于 F. III-3-3 中的神经毒素的微量混入所致. 另外, 用反相 HPLC 还对 F. III-1 和 F. III-2 组分进行了进一步的分离, 得到了若干蛋白成分, 但它们均无毒性作用, 它们的 LD_{50} 均大于 20mg, 有的甚至超过了 90mg/kg 体重, SLP 也均低于 8.6. 蝎蛇毒素分离与纯化过程所获得的各有关定量数据均列于表 1 中.

表 1 短尾蝎蛇毒素分离与纯化的有关定量数据

步 骤	组 分	参照图谱	毒性 LD_{50}^a (mg/kg)	致死比效 ^b (LD_{50}/A_{280})	回收率 (%)
粗 毒	—	—	1.25	33.3	100
Sephadex G-25	S _I	图 1(a)	1.5	49	90.18
Sephadex G-50	F. III	图 1(b)	0.75	52.08	10.3
RP-HPLC	F. III-3	图 2(a)	0.15	260.42	2.8
RP-HPLC	F. III-3-1	图 2(b)	0.095	400.8	2
	F. III-3-2		0.888	37	0.73
	F. III-3-3		1.25	22.2	0.145
CM- Sephadex C-50	AgTx-1 (β_1 -AgTx)	图 3(a)	0.075	666.7	—
	AgTx-2 (β_2 -AgTx)	图 3(b)	0.51	90.97	—
	AgTx-3	图 3(c)	6.6	5.0	—

a) 对小鼠的半致死剂量, b) 参见材料与方法章节中的叙述.

2.3 毒素的纯度以及分子量的电泳测定

AgTx-1, AgTx-2 和 AgTx-3 在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶板电泳图谱上均呈现出了一条区带, 分子量测定结果表明, 3 个毒素蛋白的分子量均在 15000 Da 左右 (图 4).

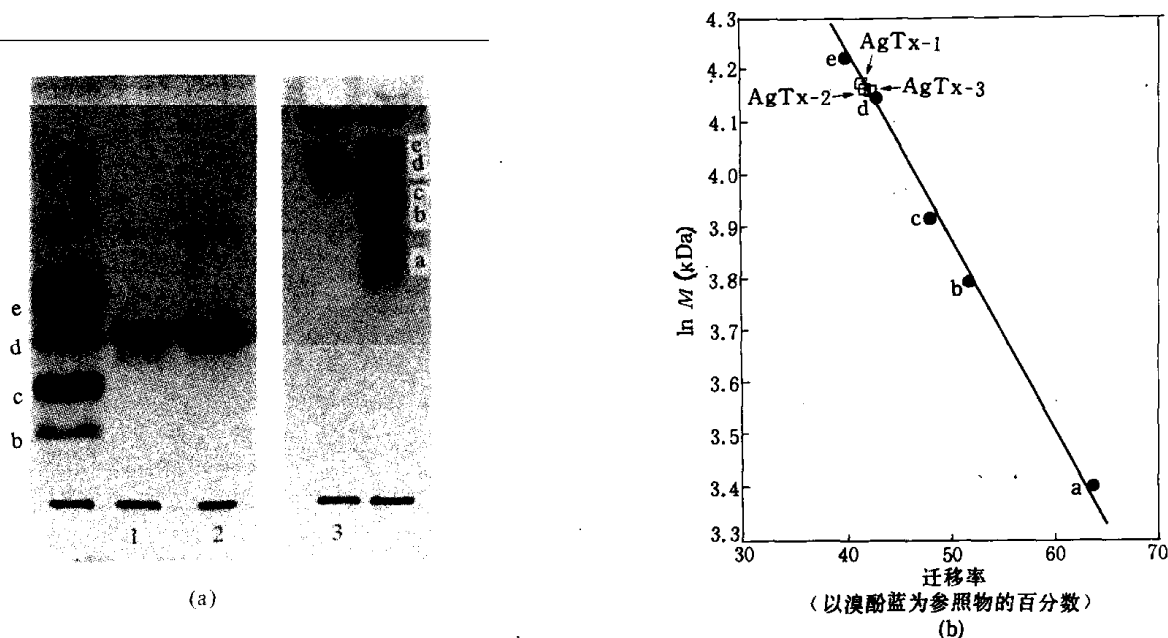


图 4 短尾蝮蛇毒素的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的纯度鉴定及分子量测定^[7]

(a) 为毒素的电泳纯度鉴定图谱, 图中 1, 2, 3 分别为毒素 AgTx-1, AgTx-2 和 AgTx-3; (b) 为毒素的分子量测定结果, 图中的 a, b, c, d 和 e 分别为 myoglobin III, II, I, I+II, 以及 myoglobin 标准分子量肽段样品, 它们的分子量依次为 2512, 6214, 8159, 14404 和 16949 Da; 测定结果表明: AgTx-1, AgTx-2 和 AgTx-3 的分子量均在 15000 Da 左右

2.4 毒素对小鸡颈二腹肌乙酰胆碱敏感性的作用

图 5 中的 (a), (b), (c) 分别给出了 AgTx-1, AgTx-2 和 AgTx-3 对小鸡颈二腹肌标本乙酰

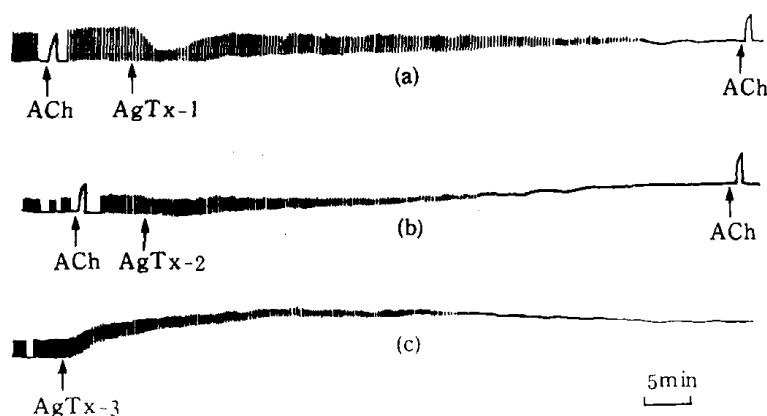


图 5 AgTx-1(a), AgTx-2(b) 和 AgTx-3(c) 分别对小鸡颈二腹肌标本的接头传递和乙酰胆碱敏感性的作用

加入标本槽中的乙酰胆碱(ACh)浓度: (a), (b), (c) 分别为 6×10^{-6} , 1×10^{-5} 和 1×10^{-5} g/ml;
加入的毒素浓度 AgTx-1, AgTx-2 和 AgTx-3 分别为 0.15, 0.25 和 0.26 mg/ml

胆碱敏感性的作用的实验结果. 由图可以看出, 标本的接头传递可被 AgTx-1 或 AgTx-2 完全阻遏, 并且在阻遏后其肌肉对乙酰胆碱的敏感性不受影响. 但在 AgTx-3 的作用下, 标本却出现了与金环蛇细胞毒素作用相似的强直性挛缩现象^[10], 与此同时, 标本对乙酰胆碱的敏感性也随之消失. 以上结果提示: AgTx-1 和 AgTx-2 均应为突触前毒素, 而 AgTx-3 则应属细胞毒素.

2.5 毒素的氨基酸组成

AgTx-1, AgTx-2 和 AgTx-3 的氨基酸组成分析结果以及文献中有关的毒素, 如 β -AgTx 的氨基酸组成一并列于表 2. 它们的氨基酸残基总数均为 122 个左右. 从表 2 不难发现, 不但

表 2 短尾蝮蛇毒素的氨基酸组成

氨基酸	AgTx-1 (β_1 -AgTx)	AgTx-2 (β_2 -AgTx)	AgTx-3	β -AgTx ^{b)} (β_1 -AgTx)	PLA ₂ ^{c)} (Basic)
Asx	15.46(16)	16.08(16)	14.78(15)	16	14
Thr	7.82(8)	6.87(7)	5.22(5)	8	4
Ser	4.47(5)	4.60(5)	5.36(5)	5	5
Glx	13.93(14)	13.56(14)	7.52(8)	13	6
Pro	3.11(3)	3.84(4)	5.30(5)	2	5
Gly	12.02(12)	12.13(12)	10.43(10—11)	13	11
Ala	3.92(4)	4.51(5)	6.78(7)	4	6
1/2Cys	— (14)	— (14)	— (14)	14	14
Val	2.08(2)	2.62(3)	5.12(5)	3	5
Met	2.06(2)	2.07(2)	3.04(3)	2	3
Ile	5.00(5)	4.66(5)	3.95(4)	5	4
Leu	5.47(5—6)	4.66(5)	4.44(4—5)	5	4
Tyr	9.38(10)	8.64(9)	8.59(9)	10	9
Phe	6.35(6)	5.84(6)	4.39(4)	6	4
Lys	8.79(9)	8.95(9)	16.22(16)	9	18
His	1.00(1)	1.07(1)	1.46(1—2)	1	2
Arg	6.22(6)	6.05(6)	5.59(6)	6	6
Trp	n. d. ^{a)}	n. d.	n. d.	0	n. d.
总 数	122—123	123	120—123	122	121

a) 未测定, b) β -AgTx(1), c) PLA₂(Basic) 为同种蛇毒中的碱性磷酸酯酶 A₂^[11].

AgTx-1 与 AgTx-2 间, 而且两者与 β -AgTx 之间除 Thr, Glx, Pro, Ala, Val, Leu 和 Tyr 残基略有差别外, 其余残基的含量均是相同的. 并且 AgTx-1 应更接近于 β -AgTx^[1]. 但 AgTx-3 分子中的 Lys 残基含量比 AgTx-1 和 AgTx-2 分子中的高近 2 倍, 与此相反, Glx 残基的含量却低近 2 倍. AgTx-3 的这一氨基酸组成特征与碱性磷酸酯酶 A₂ 的相近^[11].

2.6 毒素的部分氨基酸序列

AgTx-1, AgTx-2 和 AgTx-3 分子的自 N-端分别至 32, 38 和 35 肽的氨基酸序列示于图 6 中. 从图可看出, AgTx-1 与 AgTx-2 以及两者与 β -AgTx 的相应序列均是完全相同的^[1], 只是 β -AgTx 在第 30 位上是 Gly 残基, 而前两者在此部位上均座落的是 Trp 残基. AgTx-3 的部分氨基酸序列与前人从 *Agkistrodon*, *h. blomhoffii* 纯化的碱性磷酸酯酶 A₂ 的基本相同^[12], 只是在第 19 位上的残基有变异, 但与前人从同种蛇毒中纯化的碱性磷酸酯酶 A₂ 的相对照^[11], 起码有两个部位上的残基是不同的.

	1	1	2	3
		0	0	0
AgTx-1 (β_1 -AgTx)	NLLQFNKMIKEETGKNAIPFYAFYGCYCGWGG.....			
AgTx-2 (β_2 -AgTx)	NLLQFNKMIKEETGKNAIPFYAFYGCYCGWGGQGKPKD.....			
β -AgTx (β_1 -AgTx)	NLLQFNKMIKEETGKNAIPFYAFYGCYCGGGQGKPKD.....			
AgTx-3	HLLQFRKMIKKMTGKEPVVSYAFYGCYCGSGGRGK.....			
Ahb PLA ₂ (basic)	HLLQFRKMIKKMTGKEPVISYAFYGCYCGSGGRGK.....			
Abb PLA ₂ (basic)	NLLQFRKMIKKMTGKE.VVWYAFYGCYCG.GG.GK.....			

图 6 AgTx-1, AgTx-2 和 AgTx-3 与有关蛇毒蛋白的部分氨基酸序列的比较

图中的 β -AgTx 参见文献 [1], Ahb PLA₂ (basic) 为 *Agkistrodon h. blomhoffii* 蛇毒中的碱性磷酸酯酶 A₂ 参见文献 [12], Abb PLA₂ (basic) 为 *Agkistrodon blomhoffii brevicaudus* (旧称 *Agkistrodon halys pallas*) 蛇毒中的碱性磷酸酯酶 A₂ 参见文献 [11]

3 讨 论

前面曾提及我国江浙产日本短尾蝮蛇毒中的主要致死因子应是神经毒素组分。尽管过去对该毒中的 β -AgTx 已进行了较详细的研究^[1-5, 13, 14], 但对该毒中是否确实存在着其它神经毒素蛋白至今仍缺少全面的了解或足够的直接证据。我们认为, 一方面在蛇毒的研究中, 有时由于它种蛇毒的微量污染, 从而难以得出正确结论, 另一方面, 仅以一种蛇毒而言, 不外乎两种状况: 要么它不含某种类型的毒素, 要么由于采用的分离与纯化或鉴定方法所限, 而未能最终将其分离出来。因此, 在进行本工作之前, 一方面我们亲自到产地监控蛇种和毒液的采集, 另一方面参照 Bougis 等人为分离蛇毒中 α 型神经毒素以及相对较大分子的磷酸酯酶 A₂ 等活性蛋白而设计的最佳反相 HPLC 条件对该毒进行了分离^[9]。结果除筛选到了本文所述的 AgTx-1, AgTx-2 和 AgTx-3 3 个毒素蛋白外, 未找到相对小分子多肽一类的神经毒素。这里需要指出的是, 经图 1 所示的凝胶过滤, 蝮蛇毒中所存在的出血毒素的毒性均消失。这很可能是由于在柱层析中应用了 10% 的醋酸溶液处理粗毒并作为洗脱液所致, 但确切的原因尚有待探明。

毒性组分的 LD₅₀ 随着表 1 所示的分离纯化步骤逐渐地增高, 最后 AgTx-1 的 LD₅₀ 和 SLP 比粗毒的分别提高了约 17 和 20 倍, AgTx-2 的也分别增高了 2.5 和 3 倍, 但 AgTx-3 的却分别降低了 5 和 7 倍。3 个毒素的总含量共占粗毒的 3%, 而其中 AgTx-1 的含量为最高, 达到了 2%, AgTx-3 的最低, 尚不到 0.15%。由此表明, 蝮蛇毒中的主要致死因子确应是 AgTx-1 这类突触前毒素。而其它类型毒素(包括 AgTx-3 和出血毒素)则应是具有协同毒性效应的辅助毒素。鉴于 AgTx-1 与前文报道的 β -AgTx 不仅在 LD₅₀、在粗毒中的含量非常相近^[3, 4], 且它们的分子结构与作用机理也一致^[1, 2, 13]。我们认为, 它们应是该毒中的同一毒素蛋白分子。为便于今后统一识别, 将它们定名为 β -AgTx 或 β_1 -AgTx, 将 AgTx-2 相应地定名为 β_2 -AgTx。

在过去的文献报道中, 有关 β -AgTx 毒素分子中是否含有 1 个 Trp 残基的问题尚存疑问^[4, 15]。

然而,由本文图 6 给出的 AgTx-1 和 AgTx-2 部分氨基酸序列明确地肯定,该类毒素分子中应含有 1 个 Trp 残基,且该残基座落在其 N-端序列的第 30 位上。

AgTx-1 和 AgTx-2 的氨基酸组成资料,特别是两者间极其高度相似的分子结构特征,无疑表明,它们是互为同源异构体的毒素。有意义的是,两者间的毒性相差近 10 倍,对此,有一种较合理的推测,即 2 个毒素分子中均含有相同数目的 Asx 和 Glx 以及碱性残基,或许 Asx 和 (或)Glx 残基在 AgTx-1 分子中更多地是以 Asn 和 Gln,即中性残基的形式存在,而在 AgTx-2 分子中则更多地是以 Asp 和 Glu,即酸性残基的形式存在,那么,两者分子表面所带的总净电荷数目的不同,便会导致它们各自与靶位的结合能力出现差异。因此,尽早地确立 AgTx-2 的完整氨基酸序列将是很有意义的。

AgTx-3 是在相当高的盐浓度条件下才从 CM Sephadex C-50 离子交换柱上(图 3(b)(c))被洗脱下来的。这表明,它是个碱性蛋白。虽然它与图 6 中引用的同一蛇种毒分离的碱性磷酸酯酶 A₂ 间也具有高度的序列相似性^[11],但两者是否是同一蛋白尚难以肯定,第一,两者间在 N-末端和第 20 位上的残基的不同应是本质性的区别;第二,与 AgTx-3 的毒力相比,该 PLA₂ 的弱近 3 倍,其 LD₅₀ 达 20mg/kg 小鼠体重,并且尚能引起动物体内出血,甚至出现血尿等;第三,本工作中我们还测定了 AgTx-3 的磷酸酯酶的酶活性,结果仅约为 0.5 μmole/min/mg 蛋白(资料未示),而碱性磷酸酯酶 A₂ 的酶活性明显地要比 AgTx-3 的高。至于 AgTx-3 与 *A. h. blomhoffii* 蛇毒中的碱性 PLA₂ 的结构同源性,不但对探讨这类毒素蛋白的结构与功能关系,而且对研究同类蛇的分类与进化等都具有参考价值,对此,我们已在另文有所论述^[16]。

致谢 作者热忱地感谢小山 幸子、小岛 久和尾浦 弘子在氨基酸组成和序列测定方面的技术协助,感谢周元聪协助测定样品的酶活性。

参 考 文 献

- [1] Kondo, K., 张景康、徐 科等, *J. Biochem.*, 1989, **105**: 196—203.
- [2] 上海生理研究所第一研究室蛇毒组, *生物化学与生物物理学报*, 1976, **8**(4): 351—355.
- [3] 上海生理研究所第一研究室蛇毒组, *生物化学与生物物理学报*, 1976, **8**(4): 357—360.
- [4] 张景康等, *生物化学与生物物理学报*, 1981, **13**(3): 237—242.
- [5] 徐 科, *科学通报*, 1990, **35**(1): 1—7.
- [6] Bougis, P. E., Marchat, P., Rochat, H., *Biochemistry*, 1986, **25**: 7235—7243.
- [7] Swank, R. T., Munkres, K. D., *Anal. Biochem.*, 1971, **39**: 462—477.
- [8] Ginsborg, B. L., Warriner, J., *Brit. J. Pharmacol.*, 1960, **15**: 410—411.
- [9] 吉永华、木村 能章、徐 科等, *Comp. Biochem. Physiol.*, 1988, **90C**(1): 237—240.
- [10] 徐跃忠、徐 科, *中国药理学报*, 1984, **5**(1): 23—26.
- [11] 陈远聪, Maraganore, J. M., Reardon, I. et al., *Toxicon*, 1987, **25**(4): 401—409.
- [12] Forst, S., Weiss, J., Blackburn, P. et al., *Biochemistry*, 1986, **25**: 4309.
- [13] 杨钦照、徐 科, *生物化学与生物物理学报*, 1977, **9**(4): 357—362.
- [14] 江明特、张景康、徐 科, *两栖爬行动物研究*, 1981, **5**(19): 123—126.
- [15] 郑 乐、林南琴、钱 嵘等, *生物化学与生物物理进展*, 1992, **19**(2): 133.
- [16] 吉永华、徐 科、寺川 进, *两栖爬行动物学国际学术会议论文汇编*, 中国黄山, 1992, 39.