

从兔脑中分离得到的一个具有甲硫氨酸脑啡肽样免疫活性的多肽

陆瑞良 潘小平

(上海第一医学院针刺原理研究室)

近两年来,对于脑啡肽类似物及前体的研究,取得了较大的进展。Lewis 等^[1]从牛肾上腺髓质中分离到大小不同的包含脑啡肽顺序的多种多肽。Goldstein 等^[2]从猪垂体中分离得到强啡肽(Dynorphin)。Kangawa 等^[3]从猪下丘脑中分离得到 α -新内啡肽。Minamino 等^[4]从猪下丘脑中分离得到 β -新内啡肽。这些肽都含有甲硫氨酸脑啡肽(MEK)或亮氨酸脑啡肽(LEK)的肽段。它们的N-末端大多是酪氨酸,也有个别的为苯丙氨酸或丝氨酸。我们最近从兔脑中分离得到一个具有 MEK 免疫活性的多肽,它的N-末端为丙氨酸。

一、材料和方法

1. 肽的提取

2.5 公斤左右的家兔,迅速杀头取脑,在冰冷 Tris-HCl 缓冲液(0.04 M, pH7.6)中打成匀浆。低速离心(600 × g),弃去沉淀。高速离心(15,000 × g),弃去上清液。将沉淀用含 0.2% (V/V) TritonX-100 的 Tris-HCl 缓冲液反复洗涤,再经高速(15,000 × g)和超速(100,000 × g)离心,弃去沉淀,上清液作 DEAE 柱层析。

2. DEAE-23 柱层析

DEAE-23 纤维素(Whatman 出品)柱(30 × 2 厘米)先用含 0.2% (V/V) TritonX-100 (Roth 出品)的 Tris-HCl 缓冲液平衡。再用含 0.2% (V/V) TritonX-100 和 0.1N NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱。洗脱时流速 1 毫升/分。每管洗脱液为 3 毫升。将洗脱液转移入透析袋

内,放入冷的 0.1 N NaCl 中透析 72 小时(0℃—4℃),然后冷冻干燥。

3. Sephadex G-10 柱层析

将 DEAE 层析所得的具有 MEK 免疫活性的组分再作 Sephadex G-10(Pharmacia 出品)柱层析。Sephadex G-10 柱(22 × 1 厘米)先用 0.05M 醋酸平衡,洗脱液亦为 0.05M 醋酸溶液。收集层析组分,每管 3 毫升,冷冻干燥。

4. 放射免疫分析

放射免疫分析用的药箱由上海市高血压研究所邱喜盛同志提供。根据他们的方法^[5],略作改良。反应管中样品及 PELH 总量为 0.1 毫升,¹²⁵I-MEK 0.1 毫升(6,000—8,000 cpm),MEK 抗血清(最终工作浓度为 1:1,000)0.1 毫升,总体积为 0.3 毫升。MEK 的检出范围从 400pg 到 25600pg,重复性良好。

5. 丹磺酰化

在盛有干燥样品或标准 MEK 的玻璃小试管(直径 3—4 毫米)中,加入 20 微升 NaHCO₃(0.2M, pH9.5),再加入 DNS-Cl 溶液 20 微升(2.5 毫克/毫升丙酮),37℃ 保温 1 小时,加入 1N 盐酸,使溶液呈酸性(pH4.0 左右)以水解多余的 DNS-Cl。真空干燥。

6. 聚酰胺薄膜(7 × 7 厘米,浙江黄岩化学分析材料厂出品)层析

在上述丹磺酰化后的干燥样品管或标准 MEK 管加入甲醇 3—5 微升后点样,用上升法在密闭缸中进行单相层析。分别用正丁醇:正庚烷:冰醋酸 = 5:5:1 (V/V/V) 和苯:冰醋酸 = 9:1 (V/V) 溶剂系统展开。

7. 末端分析

将丹磺酰化的样品中加 6N 盐酸, 保温 (100℃—105℃) 20—24 小时, 真空干燥。加入甲醇 3—5 微升后在聚酰胺薄膜片上点样。点样中心距两边各 1 厘米, 在密闭缸中作双相层析, 分别用 1.5% 甲酸 (V/V) 和苯:冰醋酸=9:1 溶剂系统展开。根据层析中的 R_f 值初步定出氨基酸后, 再将标准氨基酸与样品混合, 用内标法初步确定末端。

二、结果和讨论

1. DEAE-23 柱层析的结果如图 1。随着蛋白峰的出现, MEK 的免疫活性也出现一个高峰。但免疫活性峰比蛋白峰稍落后, 说明蛋白峰中具有 MEK 免疫活性物质。两者不完全平行。

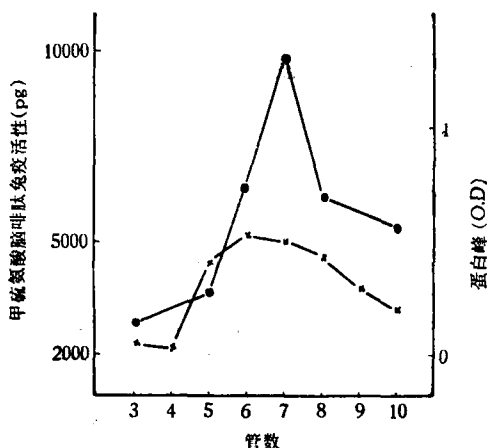


图 1 DEAE 柱层析组分的蛋白质吸收曲线和 MEK 免疫活性曲线

×——× 蛋白质吸收曲线 ●——● MEK 免疫活性曲线

2. Sephadex G-10 柱层析的结果如图 2。在第二管出现蛋白峰, 第三管蛋白峰最高, 以后逐渐降低, 出现一段较为平坦的曲线。MEK 的免疫活性峰在第三管出现而第四管为高峰, 之后逐渐下降, 到第十三管处又出现一个较小的高峰。

将标准 MEK 作 Sephadex G-10 柱层析, 用同样的方法收集组分, 然后用放射免疫分析法筛选。看到标准 MEK 的免疫活性峰在第十二管和十三管附近, 提示在第四管附近出现

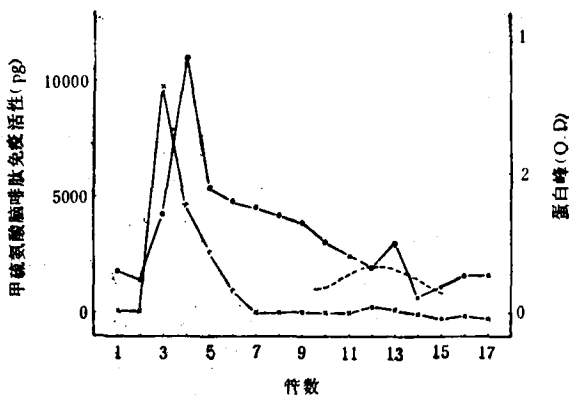


图 2 Sephadex G-10 柱层析组分的蛋白质吸收曲线和 MEK 免疫活性曲线

×——× 蛋白质吸收曲线; ●——● MEK 免疫活性普筛曲线; ———标准 MEK 的免疫活性峰

的活性峰不是 MEK。

3. 聚酰胺薄膜层析

将丹磺酰化的样品(第四管附近的组分)和标准 MEK 在聚酰胺薄膜上点样后进行单相层析。当用正丁醇:正庚烷:冰醋酸=5:5:1 溶剂系统展开时, 丹磺酰化的样品的 R_f 值为 0.86, 而丹磺酰化的标准 MEK 的 R_f 值为 0.58。当用苯:冰醋酸=9:1 溶剂系统展开时, 丹磺酰化的样品的 R_f 值为 0.42, 而丹磺酰化的标准 MEK 的 R_f 值为 0.29。见图 3。

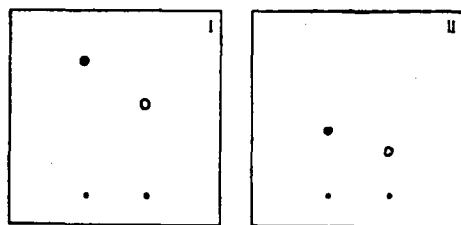


图 3 聚酰胺薄膜层析图谱

I、溶剂系统:正丁醇:正庚烷:冰醋酸=5:5:1

II、溶剂系统:苯:冰醋酸=9:1

● 丹磺酰化的样品 ○ 丹磺酰化的标准 MEK

根据 Sephadex G-10 柱层析的洗脱位置和聚酰胺薄膜层析中的 R_f 值, 提示第四管及其附近的组分是一个具有 MEK 免疫活性而不同于 MEK 的肽类物质。

4. 末端分析和分子量

将丹磺酰化的样品水解后在聚酰胺薄膜片上作双相层析, 得到 N-末端氨基酸, 用标准氨

基酸内标法证明为丙氨酸。根据在层析中的洗脱位置,估计分子量为 1000 左右。

5. 放射免疫测定

我们所使用的 MEK 放射免疫药箱,抗 MEK 血清的特异性较好。它与催产素、加压素、血管紧张素 I、血管紧张素 II、徐缓激肽、促黄体生成释放激素、促甲状腺激素、吗啡、纳洛酮、 β -内啡肽、LEK 等均无交叉免疫,与胰岛素的交叉免疫小于 1%^[9]。所以,我们得到的 MEK 免疫反应物质不是上述几种物质中的一种。

6. 在提取过程中得到的沉淀,相当于 P₂ 组分,含有丰富的神经突触膜,我们用层析分离得到的肽可能是膜本身结合的肽,也可能是与

受体结合的内源性活性物质,经 TritonX-100 的作用而分离出来的。

参 考 文 献

- [1] Lewis, R.V. et al.: *Science*, **208**, 1459, 1980.
- [2] Goldstein, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **76**, 6666, 1979.
- [3] Kangawa, K. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **99**, 871, 1981.
- [4] Minamino, N. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **99**, 864, 1981.
- [5] 陆以信等:《生物化学与生物物理学报》, **12**, 115, 1980.

[本文于 1983 年 1 月 3 日收到]

简报

显微分光光度法测定 Co⁶⁰ 辐照后大白鼠外周淋巴细胞核内 DNA 含量变化

陈玉玲 宋兰芳

(中国科学院生物物理研究所)

显微分光光度法是利用分光光度法的原理,以一定波长的单色光在显微镜下对生物样品微细结构中的化学物质进行定量测定。显微分光光度法测定的不是一个细胞,而是一个细胞群体内的某种物质(如 DNA),其中各个细胞内的物质含量不完全相同,然而,一个细胞群体的某物质含量有一定的分布,通常用组织图来表示,正常细胞胞核的 DNA 含量只与染色体的数目有关,如呈规律性的成倍增加,即为 2 倍体、4 倍体等。用这种方法,可以鉴定正常细胞受到某种外界环境刺激后所发生的变化,如癌变等。

我们采用这种技术探测大白鼠受 Co⁶⁰ γ 射线照射后外周血淋巴细胞核内 DNA 含量的变化。

一、材料和方法 选择体重为 150g—200g 的雄性大白鼠,每 16—20 只为一批,进行 Co⁶⁰ γ 照射,剂量为 200r,共做五批。分别在照后 24 小时,72 小时、1 周、2 周各取出 2—3 只大白鼠,抽心血(每次用 2 只未照射的大白鼠作对照,取血量每只为 1ml),2000 转/分离心 20 分钟,弃上清液取中间的白细胞层,用 PBS 缓冲液洗 2—3 次,后放入甲醇-乙酸 3:1 固定液中在冰箱内固定 1 小时。离心后去掉固定液,滴入适量的缓冲液,用滴管吹打均匀滴在冰湿的载玻片上,晾干后

用 Feulgen 染色。为避免误差,我们将各时期制备出的样品同在一个缸内染色。染好后晾干。在显微镜下挑选淋巴细胞分布均匀且分散的片子封固,晾干后用北京市中医研究院的 M,P,V-2 型显微分光光度计测量核内 DNA 含量。

二、结果与讨论 由图可见,大白鼠在未受照射前其外周血淋巴细胞群体分布很集中,核内 DNA 含量较恒定。当大白鼠受 Co⁶⁰ γ 射线 200r 照射 24 小时后,其外周血淋巴细胞核内 DNA 的含量明显下降,但细胞群体分布仍较集中。在受照射 72 小时后,细胞群体的分布很不集中,包含有各种 DNA 含量的细胞。照后 1 周核内 DNA 含量下降,但分布又趋集中。照后 2 周已见有明显恢复,核内 DNA 含量及群体分布趋正常,但还没完全复原。这一测量结果与我们在电镜下所观察的是一致的。在电镜下观察大白鼠照后 72 小时形态发生很大变化;核固缩,核、质比变化明显,照后 2 周时核型见恢复。

我们认为,在上述剂量照射下,一方面射线对机体的外周血淋巴细胞有直接的破坏作用,使其数量急剧减少。这种直接的破坏作用又导致一系列连锁反应,包括代谢紊乱,病理变化。另一方面,射线使造血器官