

蛇毒神经毒素的放射性碘化标记

池木根 陈世铭

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

关键词 蛇毒神经毒素, 放射性碘化标记, 氯胺 T 法, 烟碱受体

目前, 生物科学的发展非常迅速, 随着对各种生物大分子的深入研究, 放射性同位素标记技术显得更为重要, 几乎所有的生命科学都涉及到这一技术的应用。蛇毒神经毒素是一种小分子量蛋白质, 用 ^{125}I 标记后可作为研究烟碱受体的一种示踪物。碘化掺入蛋白质目前使用得最多的方法是氯胺 T 法^[1,2], 氯胺 T 碘化标记最关键的是氧化反应, 将碘原子氧化成碘分子而发生标记反应^[3], 然后在酪氨酸残基的苯环或组氨酸残基的咪唑环上发生共价结合, 生成带有放射性的化合物。这种标记方法简便、易行, 重复性好和产率稳定, 可标记微量蛋白质。用氯胺 T 法标记的蛇毒神经毒素是研究 N-AchR 理想的工具^[4,5]。

一、实验材料

蛇毒神经毒素从眼镜蛇 (*Naja naja asra*) 毒干粉中分离^[6]。Na ^{125}I 为中国科学院原子能研究所产品。氯胺 T 和偏重亚硫酸钠、碘化钾为北京化工厂产品。 γ -免疫计数器为西安二六二厂产品。

二、方法和结果

1. 蛇毒神经毒素的放射性标记和分离

50 μl (3.8mg/ml) 蛇毒神经毒素置反应瓶中, 加入 Na ^{125}I 溶液 3mCi, 混合后, 加入 50 μl (10mg/ml) 氯胺 T, 氧化反应 1min 后立即注入 50 μl 偏重亚硫酸钠 (30 mg/ml) 终止反应。然后向反应体系中加入 2 滴 10% 的 KI 溶液, 无黄色表明反应终止完成。为了将标记毒素与残存的游离 Na ^{125}I 分开, 将反应液上 Sephadex G-25 层析柱 (1.2cm $\times$ 16cm) 分离, 上样前, 先加 200 μl BSA (10mg/ml) 使柱先饱和和吸附, 然后上样品。洗脱用 0.05 mol/L (含 0.14mol/L NaCl) 磷酸缓冲液, 流速为 0.3ml/min, 每管收集 1ml, 并用 γ -免疫计数器测定, 见图 1。从图 1 可以算出标记率为 92%, 比放射性为 120Ci/mmol。

2. 标记化合物的活性测定

用适当稀释的蛇毒神经毒素标记物与过量的 N-AchR 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1h 后, 上 Sephadex G-75 层析柱

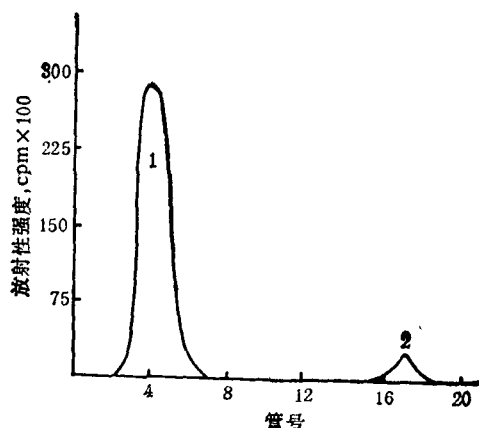


图 1 标记毒素与游离放射性 NaI 在 Sephadex G-25 层析柱上的分离

第 1 峰为标记毒素, 第 2 峰为放射性 NaI

(1.5cm $\times$ 16cm) 分离。用 0.05 mol/L pH 7.5 磷酸缓冲液洗脱, 分部收集后, 在 γ -免疫计数仪上检测。实验表明, 标记化合物与提纯的 N-AchR 有很好的结合 (见图 2)。根据层析分离的测定结果, 标记物的生物

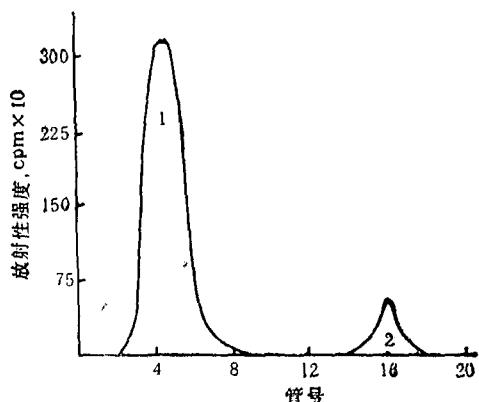


图 2 受体-标记毒素复合物与游离标记毒素在 Sephadex G-75 层析柱上的分离

第 1 峰为复合物, 第 2 峰为游离毒素

(下转封三)

(上接第 477)

活性达 80%, 这种标记物是研究 N-AchR 理想的放射性配体^[4,5]。

三、讨 论

标记时,要求达到高比放射性,但又不能因加入过量的放射源,而造成配体活性的损失,降低了标记物结合活性,故必须选择最佳条件。为此,供标记的放射源的浓度应在 40mCi/ml 以上,以便反应总体积要求在 0.2ml 以下,关键是氧化剂的量和反应时间要适中,才能得到理想的标记物。蛇毒神经毒素是一种小分子量蛋白质,用 Na¹²⁵I 标记较为理想。根据我们多年来的标记结果表明,毒素蛋白与氯胺 T 的用量比为 1:5 (W/W),标记效果较好,标记率可达总放射性的 92 ± 0.4%,比放射性为 114 ± 19.8Ci/mmol,标记物生物

活性达 80 ± 10.6%。当用量比为 1:2 时,标记物生物活性虽有提高,但标记率只有 29.7%,比放射性为 34 Ci/mmol。氯胺 T 过多会损伤毒素的生物活性。

参 考 文 献

- 1 Bolton A E, Hunter W M. *Biochem J*, 1973; **133**: 529
- 2 Aharonov Aharon, Gurari Dalia, Fuchs Sara. *Eur J Biochem*, 1974; **45**: 297
- 3 Kuenzle C C, Döbeli M. *Experientia*, 1973; **29**: 800
- 4 陈世铭,池木根. 中国药理学报,1986;7(5): 401
- 5 陈世铭,池木根,杨怡等. 动物学研究,1987;8(1): 39
- 6 徐浩鹏,孙曼昇,周廷冲. 军事医学科学院院刊,1982; (4): 447

[本文于 1990 年 10 月 12 日收到,1991 年 2 月 11 日修回]

生物化学与生物物理进展

PROGRESS IN BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS

1974 年创刊(双月刊) Start Publication in 1974 (Bimonthly)

1991 年 第 18 卷 第 6 期 (12 月出版)

Vol. 18 No. 6; 1991 Dec.

主 办 中国科学院生物物理研究所
北京市朝阳区大屯路 15 号
邮政编码: 100101

编 辑 《生物化学与生物物理进展》
编 委 会
生物物理研究所

主 编 林 治 焕
出 版 科 学 出 版 社
北京东黄城根北街 16 号
邮政编码: 100707

印刷装订 中国科学院印刷厂
总发行处 北京报刊发行局
订购处 全国各邮电局
国外总发行 中国国际图书贸易总公司
北京 399 信箱

Sponsored by Institute of Biophysics,
Academia Sinica

15 Datun Road Chaoyang District Beijing 100101, China

Edited by Editorial Board of Progress in
Biochemistry and Biophysics
In: The Institute of Biophysics

Editor-in-Chief Lin Zhihuan

Published by Science Press

16 Donghuangchenggenbeijie, Beijing 100707, China

Printed by The Printing House of
Academia Sinica

Distributed by Beijing Post Office

Subscriptions Domestic Local Post Offices

Foreign Distribution China International
Book Trading Corporation
P. O. BOX 399, Beijing, China

国内统一刊号: CN 11-2161 邮发代号: 2-816 国外刊号: BM 408 定价: 3.15 元

公 开 发 行