

烟碱样胆碱能受体的分离与提纯

孙 曼 霁

(军事医学科学院药理毒理研究所)

烟碱样胆碱能受体 (N-ChR) 的功能是把结合的配体与离子孔的开启在突触后膜上偶联起来。乙酰胆碱(ACh)可能就是通过使 ChR 产生构象变化而发挥作用的。N-ChR 的分离和提纯为 N-ChR 在分子水平上的研究提供了实验材料。

一、实验材料的选择

胆碱能受体的存在在药理学标本上得到较充分的证实,但生物化学的分析研究在六十年代以后才开展起来,这主要归功于富含N-ChR 的鱼类发电器官及 N-ChR 的专一性高亲和性配体蛇毒突触后神经毒素的发现,加以亲和层析方法学上的成功,使得 N-ChR 的生化研究成为现实。一般根据实验目的选用适当的材料,但由于 ChR 蛋白在膜蛋白中占有很小的比例,所以生物化学家首先选用了丰度高的材料,如电器官(表1),而后将获得的经验推及其它组织材料上去。

表 1 烟碱受体的丰度^[1]

组 织	N-ChR 含量 (nmole/kg)
电鳗电器官	1000
电鳗电器官	50
骨骼肌	1
去神经骨骼肌	50
脑	0.1~1

二、电器官 N-ChR 的溶液化

N-ChR 是膜上的一种结合蛋白,无论低或高离子强度的盐溶液或长时间的超声波处理都不能使 N-ChR 溶液化^[12]。有效的方法是使用去污剂,十二烷基磺酸钠 (SDS) 使蛋白质溶液化效力最高(表 2),但 N-ChR 及 AChE 完全失

活,即便以沉淀法或透析法去除 SDS 后,活性也只能分别地恢复 7% 及 25%。把 SDS 加到 lubrol (一种非离子型去污剂) 溶液化的样品中达 1% 浓度时,也可使 N-ChR 结合 ACh 的能力下降 50%。说明 SDS 对蛋白质影响很大,不适用于溶液化的目的。表 2 中其它几种去污剂均可采用, lubrol WX 以终浓度 1% 为好。小于 1% 溶液化效率差;高至 3% 时, N-ChR 的回收率未见增高,但对配体的结合力却有下降。吐温 80、60、40、20、Brij 35 及 emulphogen BC-720 等都曾使用过。

表 2 去污剂使电鳗电器官 N-ChR 溶液化的效率

(用含 1% 去污剂的任氏液将 120,000g 离心的电器官沉淀制成匀浆,4℃ 振摇半小时,再经 100,000g 离心,取上清液测定)^[3]

去污剂	上清液中 蛋白含量 (mg/ml)	对 0.8μMACh 的结合力		N-ChR 结合力的 回收率 (%)
		(nmole/ gm 组织)	(nmole/ mg 蛋白)	
无去污剂(对照)	0.50	0	0	0
离子型				
十二烷基磺酸钠	2.65	0	0	0
胆酸钠	1.44	0.40	0.28	58
脱氧胆酸钠	2.08	0.47	0.23	69
牛磺胆酸钠	1.94	0.55	0.28	80
非离子型				
Triton X-100	1.78	0.44	0.25	64
Lubrol WX	1.54	0.45	0.29	67

三、分离提纯方法

自从发现膜结合的蛋白质可以被去污剂溶液化以来,经典的生化分离手段就用来做 N-ChR 分离纯化的尝试,但是盐析分段分离、离子交换层析、凝胶过滤、等电聚焦、超滤及沉降速度离心等方法,无论单独使用或合并使用虽有

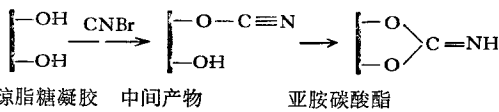
某种程度的提纯，却都达不到理想的纯度和满意的产率^[2,3]，因为经去污剂溶液液化的许多膜蛋白，其 Stoke 半径，沉降系数，等电点及在一些树脂上的层析性质都很相似，难以达到有效地分离。目前成功地分离纯化 N-ChR 的方法是亲和层析法及蔗糖密度梯度离心法。

1. 亲和层析法 人工制备的 N-ChR 亲和层析凝胶有季铵离子型和生物毒素型两类。

1) 毒素型亲和凝胶层析

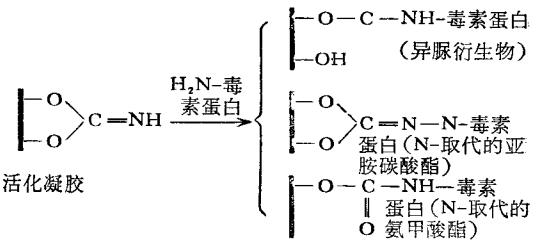
(1)载体 曾用过的载体有 Sepharose 4B, Sepharose 2B 及 ECD-Sepharose 4B。后一种凝胶较未处理者稳定，100℃ 时也没有糖溶解。

(2)活化 一般以卤化氰为活化剂。卤化氰活化多糖凝胶是一简便易复演的反应，一步完成，反应非常温和，对凝胶的物理性质无明显影响。卤化氰的用量及活化时的 pH 直接影响活化程度及以后偶联配基的量。常用的方法是在自动滴定装置上 20℃ 恒温条件下进行，以 4N 或 8N KOH 或 NaOH 维持 pH 在 11.0±0.1，每次用 20ml 湿胶，加水成 1:1 悬液，取 2—5 克溴化氰粉末，一次全部加入。活化反应开始阶段温度会上升，恒温调节不那么快，需加入少量冰块。超过 20℃ 时，反应太快，pH 来不及校正使活化凝胶不稳定；低于 20℃ 反应又太慢。滴定自动停止表示反应完全，全过程约 8—12 分钟。立即加入大量碎冰，并在布氏漏斗上抽滤，再用 1—5 升冰冷的 0.1M NaHCO₃ 缓冲液 (pH9.0) 彻底洗除溴化氰。抽滤洗净的湿胶要接着进行直接或间接偶联，在一两分钟内加入蛇毒毒素或己二胺。活化的反应式为：

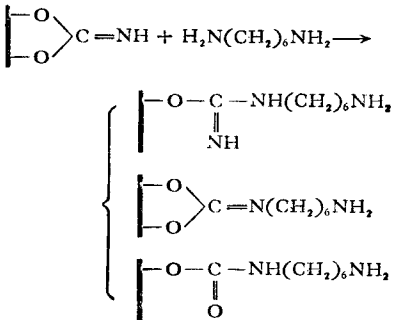


(3)蛇毒神经毒素的直接偶联 抽滤洗净的活化凝胶迅速转入冰冷的缓冲液配制的毒素溶液中，0°—4℃ 温和地搅拌 2—3 小时，偶联反应即完成。但为使活化凝胶上的反应基团全部失活，需要继续搅拌 16—20 小时，而后以大量水及适当的缓冲液洗涤之。毒素是碱性蛋白质，等电点大于 9，蛋白表面的 ω 氨基以非质子

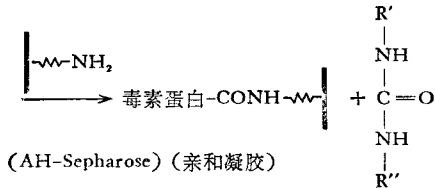
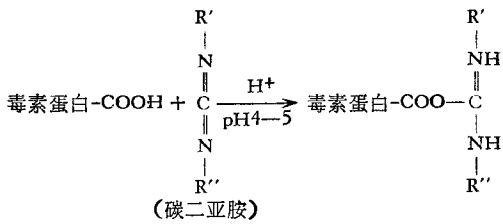
型参与偶联，故在等电点的碱侧才能有效的进行。一般 pH10 时偶联量最多，pH 大于 10.5 时，在偶联反应所需时间内活化凝胶迅速破坏，偶联量反而减少。直接偶联的反应式为：



(4) 蛇毒神经毒素的间接偶联 蛇毒神经毒素的毒性依赖于其赖氨酸残基上 ω 氨基的参加，而毒素与活化凝胶的偶联也依赖于该基团，偶联和毒性(即与 N-ChR 的结合效能)的保留是矛盾的。文献报道直接偶联可获 90% 以上的偶联率，但仅能保留 10% 以内的结合 N-ChR 的能力^[7,9]。故有人采用对偶联不太合适的 pH 使 ω 氨基部分地保持非质子化状态，减少毒素与活化凝胶的多点结合以期多保存一些活性，但终不是根本解决的办法。为要达到高偶联率及高结合力两个目的，曾尝试引进己二胺臂，以其一端的氨基与活化凝胶连结，另一端氨基与毒素蛋白的羧基相偶联，从而使赖氨酸残基的 ω 氨基留空以保存其结合力。己二胺一般用 1—2M 浓度。活化凝胶与己二胺连接的反应式为：



连接己二胺臂的凝胶商品名为 AH-Sepharose 4B，其己二胺的氨基可利用碳二亚胺类化合物与毒素蛋白的羧基缩合成肽键，从而完成亲和凝胶的合成。缩合反应的反应式如下：



(5) N-ChR 的分离纯化 电器官匀浆 100000g 离心所获沉淀经去污剂溶液化后,再经超速离心,取上清液,用柱层析法或批量法选择性的吸附 N-ChR。不被吸附的杂蛋白用平衡液洗去。毒素(亲和凝胶配基)与 N-ChR 之间主要靠疏水键及氢键结合,但因毒素蛋白是碱性蛋白质,等电点大于 9,在中性 pH 时带少量正电荷,可以小部分地借静电引力与 N-ChR 及 AChE 的阴离子部位结合,故要用 0.1—1M NaCl 将 AChE 洗除;当然这也会损失一些 N-ChR。毒素型亲和凝胶与 N-ChR 的结合比季铵型强,大量的 N-ChR 需用烟碱样胆碱能配体才能选择性地解吸附。平衡液、洗涤液及解吸附液中一般均含有一定浓度的去污剂。毒素型亲和凝胶在 23℃ 比在 5℃ 吸附及解吸附效率高,产率多 11 倍,因为温度低时与 N-ChR 亲和力差,主要靠静电引力结合,而不是亲和吸附^[8]。这一点与 Lester^[11] 发现的低于 11℃ 时,蛇毒神经毒素对突触后膜的阻断作用大大减弱的现象吻合。故用毒素型亲和层析凝胶分离纯化 N-ChR 应在室温中进行。

2) 季铵离子型亲和层析 作为离子型亲和凝胶的载体有 Sepharose 2B、6B、DEAE 纤维素 DE-52、QAE-Sephadex 及 Affinose 401 Bio-Rad。溴化氰活化方法同前,活化凝胶和配基之间一般都连接一个长短适宜的臂,其直链长度为 5—33 个原子距离,偶联的配基多是三甲基铵或三乙基铵的衍生物。分离纯化 N-ChR 的步骤与毒素型基本相似,但季铵离子型亲和凝

胶主要借库仑引力与 N-ChR 的阴离子部位结合,故平衡液及洗涤杂蛋白的缓冲液中只能含有低浓度 NaCl,其浓度范围为 0.1—0.16M。N-ChR 选择性解吸附也用烟碱样胆碱能配体,但也有用 0.1—0.5M NaCl 者。

2. 蔗糖密度梯度离心法^[17,18] 亲和层析法可以有效地分离 N-ChR,但有人认为溶液化的 N-ChR 经过亲和层析柱会改变受体蛋白的性质,在解吸附及透析过程中,胆碱能配体长时间与 N-ChR 接触也可能引起 N-ChR 的某种改变,所以又发展起一种蔗糖密度梯度离心法。首先制备富含 N-ChR 的膜段落,经溶液化后再分离 N-ChR,可以达到与亲和层析法相同的纯度。

电器官以水制成匀浆,5000g 离心除去渣滓,上层液再经 10000g 离心获得膜粗制品沉淀,用 32% 蔗糖悬浮,加在 34、37.5 及 41.5% 蔗糖非连续梯度上,100000g 离心 6 小时,收集 37.5% 梯度处的段落,而后经稀释、离心及悬浮,再在 35—43% 蔗糖连续梯度上同样离心一次,收集富含 N-ChR 的段落。此段落用 4% TritonX-100 溶液化,在有 10mM 2-巯基乙醇的条件下,在 5—20% 蔗糖连续梯度上离心,即获 9S 的纯化 N-ChR 蛋白。产率 50mg/Kg 电器官,与 α-毒素的结合活性为 7—9nmole/mg 蛋白质。等电聚焦电泳在 pH5.3 处出现单一区带。

四、实验材料的稳定性

文献中记载有过亲和凝胶,蛇毒及受体材料在不同条件下的稳定性质,对实验的进行有实际的参考价值。现汇集于表 3 (见下页)。

小 结

N-ChR 的提纯已经达到蛋白单一的纯度。最有效的方法是亲和层析及蔗糖密度梯度离心法。N-ChR 蛋白的氨基酸组成成分已经清楚,目前对 N-ChR 的重组及其与离子通道的关系、N-ChR 与配体的相互作用等,正在开展广泛的研究。

表 3 实验材料的稳定性

材 料	稳 定 性 质																																						
琼脂糖凝胶	不能干燥,不能冻结,否则产生不可逆皱褶、结构破坏 ^[4,5] 。不耐许多有机溶剂 ^[4] 。 凡破坏氢键的试剂均可破坏之,如尿素、盐酸胍 ^[4] 。 不能加热灭菌、沸水中溶解,40℃以下水中仍保持为不溶性凝胶,高温则破坏 ^[4] 。 微生物生长使之结块,凝胶水悬液加防腐剂如 0.02% (W/V)NaN ₃ ,可长期保存于零上冰箱中,很少变性 ^[4] 。 pH要在 4—9 之间,过酸或过碱,都不稳定 ^[4] 。 0.1NNaOH 中,在室温至少稳定 2—3 小时 ^[5] 。 1NHCl 中,在室温至少稳定 2—3 小时 ^[5] 。																																						
活化凝胶	活化凝胶不稳定,pH 大于 10.5,则迅速破坏 ^[4,5] 。 微碱环境中,4℃时,至少稳定 4 小时 ^[4] 。 以丙酮使活化凝胶逐步脱水,而后在真空中将丙酮挥发,可获活化凝胶干粒,密封之在零上冰箱中可保存数月 ^[4] 。																																						
亲和凝胶	偶联好的亲和凝胶十分稳定 ^[4] 。 在 4℃ 加防腐剂条件下,可以水悬液形式储存,保存时间只取决于偶联的配基 ^[5] 。 直接偶联的毒素型亲和凝胶,在 4℃ 有 0.1%NaN ₃ ,存在时保存 6 个月不丧失与 N-ChR 的结合能力 ^[5] 。																																						
蛇 毒	对热稳定性好,在醋酸缓冲液 (pH5.8) 中的稳定性如下 ^[13] : <table><tr><th rowspan="2">时间(分钟)</th><th colspan="3">不同温度下毒性保存率(%)</th></tr><tr><th>80℃</th><th>90℃</th><th>100℃</th></tr><tr><td>0</td><td>100</td><td>100</td><td>100</td></tr><tr><td>10</td><td></td><td></td><td>84</td></tr><tr><td>20</td><td></td><td></td><td>50</td></tr><tr><td>30</td><td>100</td><td>50</td><td>25</td></tr></table> 眼镜蛇毒经反复冻融处理,毒性不变。	时间(分钟)	不同温度下毒性保存率(%)			80℃	90℃	100℃	0	100	100	100	10			84	20			50	30	100	50	25															
时间(分钟)	不同温度下毒性保存率(%)																																						
	80℃	90℃	100℃																																				
0	100	100	100																																				
10			84																																				
20			50																																				
30	100	50	25																																				
膜结合的 N-ChR	膜结合的 N-ChR 冻结数月,无明显失活 ^[9] 。—20℃ 保存数月无失活 ^[2] 。电鳗电器官膜结合的 N-ChR 对热及 pH 的稳定性如下 ^[14] : <table><tr><th rowspan="2">pH</th><th colspan="2">N-ChR 结合力残留百分率(%)</th></tr><tr><th>单纯 pH 影响</th><th>pH 加 6 0℃7 分钟热处理</th></tr><tr><td>11.3</td><td>40</td><td>0</td></tr><tr><td>11</td><td>80</td><td>30</td></tr><tr><td>10.5</td><td>100</td><td>80</td></tr><tr><td>10</td><td>100</td><td>100</td></tr><tr><td>7</td><td>100</td><td>100</td></tr><tr><td>6.3</td><td>100</td><td>100</td></tr><tr><td>6</td><td>100</td><td>80</td></tr><tr><td>5.5</td><td>100</td><td>45</td></tr><tr><td>5</td><td>80</td><td>3</td></tr><tr><td>4.5</td><td>20</td><td>0</td></tr><tr><td>4</td><td>5</td><td>0</td></tr></table> 膜结合的 N-ChR 经甲苯处理则迅速破坏 ^[1] 。 SDS可使膜结合的 N-ChR 溶液化,但使之丧失全部结合能力 ^[3] 。 电器官小块在 0.1MNaCl-0.01Mtris (pH8.0) 中,2—4℃ 时,数月不失活 ^[10] 。在 —16℃ 冻结数月不失活 ^[10] 。 电器官匀浆经冰冻干燥后,—70℃ 长期保存不失活 ^[7] 。 电器官匀浆 12000g 的沉淀物可保存在液 N ₂ 中,或冰冻干燥后置 —20℃ 冰箱中 ^[6] 。	pH	N-ChR 结合力残留百分率(%)		单纯 pH 影响	pH 加 6 0℃7 分钟热处理	11.3	40	0	11	80	30	10.5	100	80	10	100	100	7	100	100	6.3	100	100	6	100	80	5.5	100	45	5	80	3	4.5	20	0	4	5	0
pH	N-ChR 结合力残留百分率(%)																																						
	单纯 pH 影响	pH 加 6 0℃7 分钟热处理																																					
11.3	40	0																																					
11	80	30																																					
10.5	100	80																																					
10	100	100																																					
7	100	100																																					
6.3	100	100																																					
6	100	80																																					
5.5	100	45																																					
5	80	3																																					
4.5	20	0																																					
4	5	0																																					

材 料	稳 定 性 质													
溶液化的 N-ChR	经 0.45 μ 微孔滤膜灭菌后装入塑料管中,0 $^{\circ}$ C 可保存 3 周 ^[9] 。 在 4 $^{\circ}$ C 时半寿期为 1 周,最好在制备后数小时内进行各种测定或柱层析 ^[2] 。 经一定冻融即失活 ^[2,9] 。 经稀释 (TritonX-100 为去污剂时),或经透析(胆酸钠或脱氧胆酸钠为去污剂时)使去污剂浓度降至 0.01% (W/V) 以下时, N-ChR 产生凝集现象 ^[2] 。 溶液化的大鼠隔肌 N-ChR 在 0 $^{\circ}$ C 无菌条件下保存 10—12 个月活性下降约 70% ^[16] 。 溶液化猫肌肉 N-ChR 在 4 $^{\circ}$ C 有 0.01%NaN ₃ 存在条件下保存数周,活性仅下降百分之几 ^[15] 。 Lubrol 溶液化的 N-ChR 的稳定性如下 ^[3] :													
	<table><tr><th>处理条件</th><th>N-ChR 活性丧失百分率 (%)</th></tr><tr><td>100°C, 2 分钟</td><td>100</td></tr><tr><td>1mM二硫苏糖醇,作用 30 分钟,而后透析</td><td>50</td></tr><tr><td>胰蛋白酶</td><td>52</td></tr><tr><td>链霉蛋白酶</td><td>72</td></tr><tr><td>磷脂酶 A</td><td>36</td></tr><tr><td>磷脂酶 C</td><td>40</td></tr></table>	处理条件	N-ChR 活性丧失百分率 (%)	100 $^{\circ}$ C, 2 分钟	100	1mM二硫苏糖醇,作用 30 分钟,而后透析	50	胰蛋白酶	52	链霉蛋白酶	72	磷脂酶 A	36	磷脂酶 C
处理条件	N-ChR 活性丧失百分率 (%)													
100 $^{\circ}$ C, 2 分钟	100													
1mM二硫苏糖醇,作用 30 分钟,而后透析	50													
胰蛋白酶	52													
链霉蛋白酶	72													
磷脂酶 A	36													
磷脂酶 C	40													
纯化的 N-ChR	纯化的 N-ChR 在下列条件下失活 ^[9] : 100 $^{\circ}$ C 3 分钟 pH 小于 6,或大于 9。 胰蛋白酶 20 μ g, 37 $^{\circ}$ C 作用半小时。 纯化的 N-ChR 在下列条件下,结合力下降不多 ^[6] 。 4 $^{\circ}$ C 置 14 天,结合力损失 10%。 0 $^{\circ}$ C 置 21 天,结合力损失 0%。													

本文承周廷冲教授审阅,谨此致谢。

参 考 文 献

[1] Waser, P. G. et al.: *Recent Advance in Receptor Chemistry* (Ed. by Gualtier F. et al.), 97 1979.
[2] Meunier, J. C. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **45**, 371, 1974.
[3] Eldefrawi, M. E. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 210, 1972.
[4] Lowe, C. R. et al.: *Affinity Chromatography*, John Wiley and Sons. 1974.
[5] Cuatrecasas, P.: *J. Biol. Chem.*, **245**, 3059, 1970.
[6] Eldefrawi, M. E. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **159**, 362, 1973.
[7] Ong, D. E. et al.: *Biochem.*, **13**, 2822, 1974.
[8] Karlsson, E. et al.: *FEBS Lett.*, **28**, 107, 1972.
[9] Klett, R. P. et al.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 6841,

1973.
[10] Biesecker, G.: *Biochem.*, **12**, 4403, 1973.
[11] Lester, H. L.: *Dissertation* 1971, Rockefeller Univ. N. Y. 1971.
[12] Briley, M. S. et al.: *Intl. Rev. Neurobiol.*, **20**, 31, 1977.
[13] Young, C. C.: *J. Biol. Chem.*, **240**, 1616, 1965.
[14] Saitoh Tsunao et al.: *FEBS Lett.*, **108**, 489, 1979.
[15] Dolly, J. O. et al.: *FEBS Lett.*, **57**, 267, 1975.
[16] Brockes, J. P. et al.: *Biochem.*, **14**, 2092, 1975.
[17] Cohen, J. B. et al.: *FEBS Lett.*, **26**, 43, 1972.
[18] Sobel, A. et al.: *Biochem. Soc. Trans.*, **5**, 511, 1977.

[本文于1982年5月12日收到]