

- 95.
- [6] Getz, M. T. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 287, 485, 1972.
- [7] Clewell, D. B. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 62, 1159, 1969.
- [8] Colman, A. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 91, 303, 1978.
- [9] 戴培桦等:《生物化学与生物物理进展》, 1, 97, 1982.
- [10] Lang, D.: *J. Mol. Biol.*, 54, 557, 1970.
- [11] Southern, E. M.: *J. Mol. Biol.*, 98, 503, 1975.
- [12] Thomas, P. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77, 5201, 1980.
- [13] Law, S. et al.: *Gene*, 10, 53, 1980.
- [14] Gorin, M. B. et al.: *J. Biol. Chem.*, 256, 1954, 1981.
- [15] Tilghman, S. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 254, 7393, 1979.

【本文于1983年3月25日收到】

49 型玻璃纤维滤纸在测定胆碱能受体中的应用

陈世铭

(军事医学科学院药理毒理研究所, 北京)

一些蛇毒的 α -毒素能与烟碱样乙酰胆碱受体形成特异的、近于不可逆的复合物。因此可用这些 α -毒素的放射性标记物定量测定此受体。但是, 首先必须把毒素与受体的结合物和游离的标记毒素分开。Miledi 等曾采用 Sephadex G-50 凝胶过滤法^[1], Meunier 等用硫酸铵沉淀法^[2], 其他还有超速离心法, 透析法等。这些方法工作量都很大, 有的敏感性差。Schmidt 等^[3]用 DEAE-Cellulose 纸片法测定分离提取的受体, 提供了一种简便快速的方法。但有的步骤仍较繁杂, 并受离子强度和 pH 的影响, 特别是纸片来源不易, 需要进口。本文报道采用国产 49 型玻璃纤维滤纸代替 DEAE-Cellulose 纸片测定膜结合烟碱样乙酰胆碱受体。

一、材料与方 法

DEAE-Cellulose 纸片 (DE81) (Whatman 公司)、49 型玻璃纤维滤纸 (49 型滤纸, 上海红光造纸厂研制), 加工成直径 2.5cm 的纸片。电鳗 (*Torpediniforms Nacline timilei*) 从我国南海捕捞。湖南眼镜蛇 (*Naja naja atra*) α -毒素按徐等^[4]的方法提取分离, 再经 Sephadex G150 凝胶柱过滤, 小白鼠腹腔注射致死量为 150 μ g/kg, 碘化钠- I^{125} 由原子能研究所供应。其他药品均为试剂规格。

按改良的 Vogel 法标记 α -毒素^[5], 分离出单 I^{125} 标记物。 I^{125} - α -毒素与过量的电鳗受体 25 $^{\circ}$ C 保温 1 小时后, 经 Sephadex G7.5 凝胶过滤柱, 证明所有的放射性都结合在受体上, 即分离得到的单 I^{125} 标记物都有与受体结合的活性。用已知浓度和比活的 [3 H]- α -毒素测定其比放射性比活为 201ci/mmol。计数采用 γ 免疫计数器 FJ-2003 型。

1. 膜结合受体的制备 取电鳗电器官 20 克, 加入 200ml 50mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.4, 内含 0.1mM 苯基甲磺酰氟 (PMSF) 作为蛋白分解酶抑制剂, 及 0.02% $NaNO_3$ 。在冰浴中用组织粉碎机, 2 万转/分, 15 秒 $\times$ 3 次, 间歇 15 秒, 制成匀浆。5000 $\times$ g 离心 12 分钟, 取上清部分加在 25ml 0.7M 蔗糖溶液上, 39000 $\times$ g 离心 70 分钟, 分成 4 个部分, 取最下面的沉淀, 重新均匀混悬于磷酸缓冲液中备用。4 $^{\circ}$ C 冰箱保存不超过一周。

2. 受体的定量测定 受体 (终浓度 1—2nM) 在 25 $^{\circ}$ C 水浴中保温 5 分钟后加入 2—3 倍量的 I^{125} - α -毒素 (终浓度 2—5nM), 继续保温 1 小时。结合反应可在 10 分钟左右完成, 而且近乎不可逆, 测得 K_D 为 $6.1 \times 10^{-12}M$ 。这为受体的定量测定提供十分有利的前提条件。由于标记物是单碘标记物, 所以可以根据结合的 I^{125} - α -

毒素量算出受体的 α -毒素结合点数量。

DE81 纸片法基本上按 Schmidt 法^[3]更换 3 次洗涤液,共洗 14 分钟。玻璃纤维滤片则置于过滤器上(图 1),共有 8 个带开关的小井,每井放一片直径为 2.5cm 的滤片,加上样品(受体与 ^{125}I - α -毒素反应的复合物及游离的 ^{125}I - α -毒素)后用冰冷的磷酸钠缓冲液抽洗滤片,每次 3ml,共 10 次,把游离的 ^{125}I - α -毒素洗掉。取出滤片,待干燥后计数。每次试验均设对照,对照管中的受体预先加入比标记毒素大 100 倍的自然 α -毒素,作用半小时,其他同试验管。



图 1 玻璃纤维滤片过滤器

滤片放在井内,预先用缓冲液湿润。
接在水泵上,每次可抽滤 8 个样品

二、结果与讨论

1. 准确性 所得计数与反应液中膜结合受体量成正比,在过量 ^{125}I - α -毒素情况下,加入不同数量的受体,从 25—200 μl 有较好的线性关系(图 2)。

测定同一个样品,其均值及标准差为 $2866 \pm 157\text{cpm}$, ($n = 12$), 变异系数为 5.5%,滤片间差别不太大。

2. 特异性 受体与 ^{125}I - α -毒素发生特异性结合,可以得到一条饱和曲线,而且这种特异性结合可被非标记的 α -毒素竞争性抑制,受体蛋白或膜碎片有一些非特异性吸附,约占总计数的 5%,这与 DE81 的结果一致,也与 Dolly 报告的结果类似^[6]。这种非特异性吸附不能被过量的非标记 α -毒素竞争性抑制,只能用对照管所得的计数加以纠正。

3. 滤片的非特异吸附 49 型玻璃纤维滤片

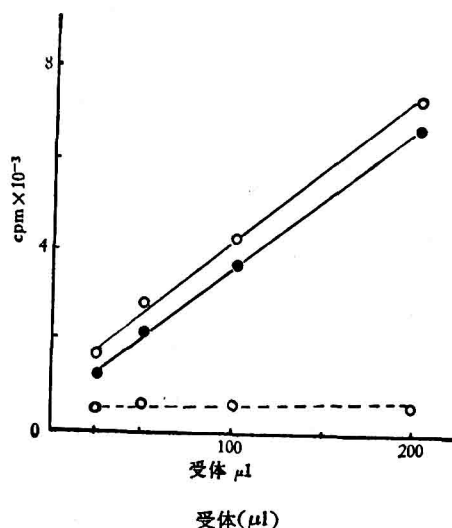


图 2 受体数量与计数的线性关系

^{125}I - α -毒素 2.5pmol/ml, 膜结合受体 1.0pmol/ml, 25℃ 孵温 30 分钟后测定。○——○: 总计数, ○---○: 非特异吸附。●——●: 受体与 ^{125}I - α -毒素结合曲线 $r = 0.995$

对蛇毒 α -毒素的非特异吸附是低的,但与溶液中标记毒素量有一定关系,所加的 ^{125}I - α -毒素量越大,吸附量也越多,在终浓度为 2—5nM 情况下,占总计数的 $4.3 \pm 2.1\%$,而 DE81 的非特异吸附占 $5.5 \pm 1.3\%$ 。

4. 药物对受体定量测定的影响 49 型玻璃纤维滤片测定烟碱样乙酰胆碱受体可以进一步用胆碱能配体对受体的作用来验证。图 3 说明氨基甲酰胆碱对受体与 α -毒素结合的影响。减少 50% 结合率的氨基甲酰胆碱浓度 (I_{50}) 为 $1.0 \times 10^{-5}\text{M}$,与 Ong 的结果类似^[7]。而丙二醇,即使是 $1 \times 10^{-3}\text{M}$,也没有看到这种抑制作用。

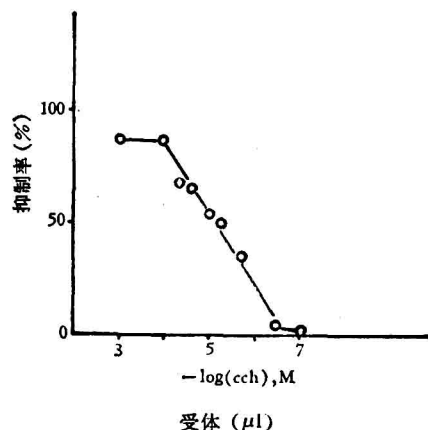


图 3 氨基甲酰胆碱(CCh)对受体与 ^{125}I - α -毒素结合的抑制

5. 两种滤片同时测定同一系列样品计数比较
 49 型滤片和 DE81 滤片测定同一系列受体样品所得计数十分相似 (表 1)。

表 1 49 型滤片 DE81 滤片计数结果比较 (cpm)

DE81	954	1422	4132	4474	4578	4406	4898
49 滤片	696	1448	4020	4472	4986	4160	4894
相差	-258	+26	-112	-2	+408	-246	-4

两种滤片同时测定膜结合受体与 ^{125}I - α -毒素结合反应的时间曲线时, 所测得的结合复合物数量也是类似的。说明两种滤片, 虽然作用方式不一样, 但分离效果基本相同 (图 4)。

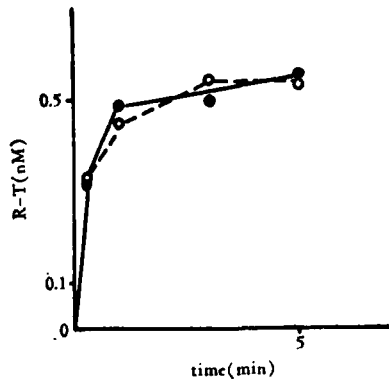


图 4 受体与 ^{125}I - α -毒素结合反应的时间进程
 ○----○: DE81 滤片测定结果; ●——●: 49 型玻璃纤维滤片测定结果。R-T 受体与毒素的结合物

在有游离配体的情况下, 分离配体和大分子的结合复合物, 最方便的是过滤吸附法。滤膜法曾用于测定 DNA 和 RNA 多聚酶的活性以及蛋白质合成的研究等^[8], 后来用于毒素与膜成分的结合研究。Schmidt 等^[3]用 DEAE Cellulose 滤膜, 改进了分析的敏感性, 后为许多作者采用^[6,9], DEAE Cellulose 是阴离子交换树脂。 ^{125}I - α -毒素的等电点为 10, 受体的等电点为 5.0, 受体与 α -毒素复合物的等电点为 5.3^[6]。在 pH7—8 时, 受体复合物被树脂吸附, 而游离的毒素则渐被洗去, 故可用于受体的定量测定。我们在预试验时也曾试用孔径 0.45 微米的微孔滤膜, 在同一条件下, 它对游离 α -毒素的吸附较

多, 准确性较差。49 型玻璃滤片厚 0.25 毫米, 孔径可阻止 0.3 微米的粒子通过, 滤过率仅万分之一。上海第二医学院等单位曾用它于细胞样品软 β 射线的测量^[10]。 α -毒素的分子量约 7000, 可滤过, 而膜碎片形成的微囊则留在滤片上。对于测定膜结合烟碱样胆碱能受体有较好的准确性, 方便快捷, 价格低廉 (表 2)。我们已用它测定多种毒物、药物对受体的影响, 受体的失敏以及与受体有关的钠离子流变化。

表 2 两种滤片测定膜结合乙酰胆碱受体比较

	准确性	非特异吸附	价格 (分/片)	来源	优点
DE81	较好	5.5 $\pm$ 1.3%	10	进口	快速、简便
49 滤片	较好	4.3 $\pm$ 2.1%	0.25	国产	更快、简便

增加测定准确性的方法有: (1) 滤片预先用非标记 α -毒素处理, 减少非特异吸附。(2) ^{125}I - α -毒素用量应比受体大 2—3 倍, 但不可过量太多, (如超过 10 倍), 以免增加空白对照的计数。(3) 滤片加样后以抽洗 8—10 次为宜, 因为此时非特异吸附低, 计数稳定。

本文蒙孙曼昇副教授审阅, 致谢。

参 考 文 献

[1] Miledi, R. et al.: *Nature*, 229, 554, 1971.
 [2] Meunier, J. C. et al.: *Biochemistry*, 11, 1200, 1972.
 [3] Schmidt, J. et al.: *Anal. Biochem.*, 52, 349, 1973.
 [4] 徐浩鹏等: 《军事医学科学院院刊》, 4, 447, 1982.
 [5] Vogel, Z. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 69, 3180, 1972.
 [6] Dolly, J. O.: *International Review of Biochemistry, physiological and pharmacological Biochemistry*, Vol. 26, pp. 257—309 (Tipton, K. F. ed.), 1979. University park Press, Baltimore.
 [7] Ong, D. E. et al.: *Biochemistry*, 13, 2822, 1974.
 [8] Bollum, F.: *Methods of Enzymology* (Colonic, S. P. and Kaplan, N. O. eds), Vol. XII(B), p. 169 Academic Press, New York.
 [9] Lo, M. M. S. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 116, 155, 1981.
 [10] 上海第二医学院基础部同位素室: 《生物化学与生物物理进展》, 6, 6, 1978.

[本文于 1983 年 4 月 6 日收到]