

Triton X-100 和去氧胆酸钠两种去垢剂对阿片受体作用的影响

李志毅 周德和 倪崇虎 池志强

(中国科学院上海药物研究所)

自从证实了动物和人脑内存在阿片受体以来,受体结合试验为阿片受体的研究提供了大量有用的信息。为了对阿片受体化学本质进行深入的研究,必须将其从突触膜上溶脱以获得溶性阿片受体。借助去垢剂是获得溶性受体的常用手段。Bidlack 等^[1]、Ruegg 等^[2]和 Simonds 等^[3]分别用非离子型去垢剂聚乙二醇辛基苯基醚 Triton X-100 (简称 Triton), 洋地黄皂甙和两性离子型去垢剂,胆酸盐的衍生物 3-(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio-1-propanesulfonate (简称 CHAPS) 获得有活性的溶性阿片受体。

本文报道 Triton 和离子型去氧胆酸盐 (简称 DOC) 两种去垢剂对大鼠脑突触膜阿片受体与阿片类药物同位素配体结合的影响,并用 DOC 从大鼠脑突触膜溶脱获得有活性的阿片受体结合位点的初步结果。

一、材料和方法

³H-纳洛酮 (40Ci/mmol) 由上海第一医学院提供, ³H-羟甲芬太尼,一种新的 μ 阿片受体激动剂^[4],即 ³H-N-[1-(β -羟基- β -苯乙基)-3-甲基-4-哌啶基]-N-丙酰苯胺 (简称 ³H-F7302) 59Ci/mmol 以及非标记药物均由我所合成。医工 1300-100 等大网孔树脂由上海医药工业研究院提供。大鼠脑突触膜阿片受体(P₂)的制备和受体结合试验以及聚乙二醇(PEG 6000)沉淀法对溶性受体活力的测定均参考文献 [4]。蛋白质浓度测定用双缩脲法。

溶性阿片受体结合位点的制备 在 P₂ 部

分加入 DOC 使最终浓度为 0.25%, 含 0.15M NaCl, 于 0—4℃ 搅拌 15 分钟, 在日立 55P-7 超速离心机, RP55T 转头, 105000g, 离心 60 分钟, 上清液经医工 1300—100 大网孔树脂 (0.5 克/毫升), 搅拌 60 分钟, 过滤, 上清液即得。

去垢剂对每种同位素配体与阿片受体结合的影响 受体结合试验, 每次三复管, 取两次实验的平均值。特异性结合系指总的结合减去过量非标记药物 (F-7302, 100 倍; 纳洛酮 1000 倍) 存在下的非特异性结合的同位素计数值。

大网孔树脂对去垢剂吸附能力的测定 在含有 1% Triton 或 DOC 的 50mM Tris.HCl pH 7.5 的缓冲液中, 加入相应的树脂湿重 0.5 克/毫升, 搅拌 1 小时, 过滤除去树脂, 在紫外分光光度计 OD₂₈₀ 测定 Triton 浓度; 用硫酸比色法 (1 毫升样品加 3 毫升浓硫酸, 小心混合后于 60℃ 加热二小时) 在 OD₅₄₀ 测定 DOC 浓度, 与标准曲线对照。

二、结果与讨论

1. 去垢剂对每种同位素配体与阿片受体结合的影响 以对照组为零, 去垢剂浓度的负对数对特异性结合增减百分比作图 (图 1、2)。当 DOC 浓度为 10⁻²% 时, 对 ³H-纳洛酮和 ³H-F7302 与受体结合的影响分别减少 18% 和 12%; 而 Triton 浓度为 10⁻²% 时, 对 ³H-纳洛酮和 ³H-F7302 与受体结合的影响分别减少 42% 和 36%。去垢剂对受体结合试验的影响受浓度的影响较大。DOC 在 10⁻²% 时对受体结合仍有

一定抑制作用;而 Triton 对受体结合的影响尤为明显。

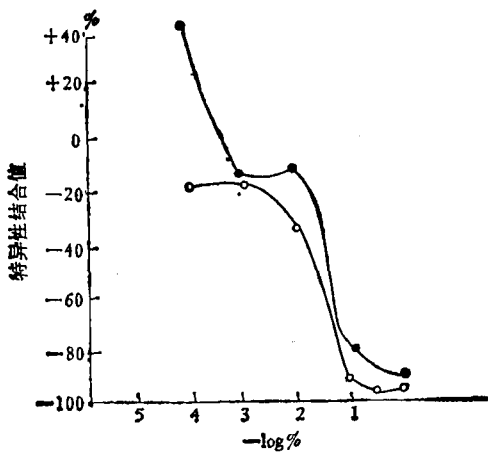


图1 不同浓度 Triton X-100(○——○)和 DOC (●——●)对 ³H-F7302 与 P₂ 结合的影响

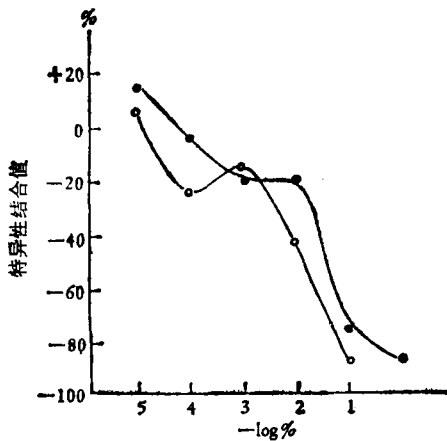


图2 不同浓度 Triton X-100(○——○)和 DOC (●——●)对 ³H-纳洛酮与 P₂ 结合的影响

2. 前已报道^[6]用大网孔树脂 XAD-2 可以吸附除去 Triton, 对蛋白质浓度并无影响。本文采用国产大网孔树脂医工 1300—100; 1300 S-12; 1200-25 等, 并与 Servachrom XAD-2; XAD-4 树脂比较, 其中医工 1300—100 树脂吸附能力最强(与 XAD-4 相当)。经此处理后的去垢剂在浓度低于 10⁻³% 时, 则 DOC 对阿片受体结合试验已无明显影响, 而 Triton 仍有明显干扰。故选用 DOC 作为溶脱阿片受体的去垢剂较为合适(表 1)。Simonds 等^[3]用 DOC 溶脱神经杂交细胞 NG108-15 细胞膜, 未能获得

有活性的阿片受体, 其 DOC 最终浓度为 2mM (约 0.1%)。根据我们的实验结果, 在此浓度下必然对受体结合试验产生严重干扰。

表 1 大网孔树脂对两种去垢剂吸附力比较

型 号	处理后 Triton 浓度%	处理后 DOC 浓度%
医工 1300-100	0.0013	0.0014
1300S-12	0.0031	
1200-25	0.050	
1300-3		0.0024
XAD-2	0.0018	
XAD-4	0.0013	0.0014

3. 当 DOC 浓度达 10⁻⁵% 时, 特异性结合值反而增高 40% (³H-F7302 阿片受体激动剂) 和 18% (³H-纳洛酮, 阿片受体拮抗剂)。Ruegg 等^[2]用洋地黄皂甙溶脱蟾蜍脑阿片受体时也曾报道, 当其浓度在 0.1% 时结合值升高 4—5 倍。Criado 等^[7]观察到微量 Nonidet P-40 和 DOC 对阿片受体结合试验结合值升高的现象, 升高的原因尚不清楚。事实上, 在 DOC 浓度 < 0.1% 时对蛋白质并无溶脱能力, 但是否由于某些内源性配体被溶脱以致受体结合位点充分暴露, 致使特异性结合值升高, 有待深入研究。

4. Ling 和 Simon^[8]用磷脂酶 A 抑制阿片受体的结合, 可被小牛血清白蛋白(BSA)逆转。我

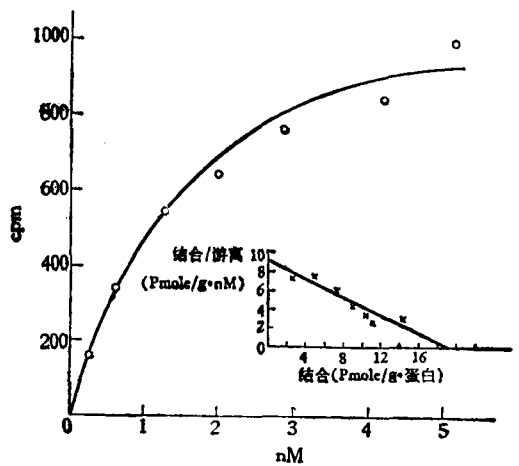


图3 溶性阿片受体结合位点与 ³H-纳洛酮结合之饱和曲线及 Scatchard 分析

们采用 1% BSA 保护不同浓度 Triton 对 ^3H -纳洛酮与阿片受体结合的影响, 结果表明并无特异性的保护作用。

5. 借助 DOC (0.25%) 和 NaCl (0.15 M) 从大鼠脑匀浆溶脱获得有活性的阿片受体结合位点, 能通过 $0.22\mu\text{m}$ (GS) 微孔滤膜; 对 ^3H -纳洛酮有高亲和力; 其特异性结合是可饱和的, 饱和浓度约为 4 nM (图 3)。Scatchard 作图, $K_d = 2.01\text{ nM}$, $r = 0.94$, $B_{\text{max}} = 18.5$ 微微克分子/克蛋白, $y = -0.497x + 9.18$ 。

参 考 文 献

[1] Bidlack, J. M. et al.: *Proc, Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 636, 1981.
[2] Rüegg, U. T. et al.: *ibid.*, **78**, 4635, 1981.
[3] Simonds, W. F. et al.: *ibid.*, **77**, 4623 1980.
[4] 周德和等:《科学通报》, 1984 年, 第 4 期。
[5] 徐珩等:《中国科学》, 1984 年, 第 8 期, 733。
[6] 周德和等:《生物化学与生物物理进展》, (6), 75, 1983。
[7] Criado, M. et al.: *J. Neurobiology*, **12**, 259, 1981.
[8] Ling Hung-Kuang, et al.: *Nature*, **271** 383, 1978.

[本文于 1983 年 11 月 4 日收到]

用高效液相色谱法测定粗制核黄素中的抗坏血酸

王玉梅 丛培红 刘存英

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

R. C. Williams 用高效液相色谱法 (阴离子交换剂^[1]和 C_{18} 反相^[2,3]) 测定抗坏血酸维生素 C。但本文采用阳离子交换柱, 以 pH5 的磷酸盐稀溶液作淋洗液。用紫外检测器检测, 可在 5 分钟内完成分离与测定, 其回收率为 $95 \pm 8.7\%$, 且无杂峰, 因此优于 S. P. Sood 等人的色谱法。

用本法已测定五批粗制核黄素中微量抗坏血酸, 结果与比色法基本一致, 但本法较比色法快速、简便。

仪器 日立 635A 型高效液相色谱仪, 检测器为紫外单波长分光光度计; 0.56 记录仪, 834 型数字处理机; 不锈钢柱内径为 4 毫米, 长为 500 毫米; 填充剂为日立 2618 阳离子交换树脂, 粒度 20 微米, 装柱前树脂预先用盐酸和氢氧化钠处理。填充压力为 150 公斤/厘米²。

样品制备 参照文献[4]并略加修改。取适量样品加偏磷酸于超声波上直接抽提, 代替常用研磨法处

理。滤去残渣, 滤液通过经酸处理过的活性炭^[5], 接取一部分滤液供上机用。全部操作均在避光下进行。所用试剂均为 A, R 级。

结果与讨论 色谱法研究生物材料时, 常用离子交换填充柱, 这是由于磷酸型和季铵盐型离子交换基团较稳定, 选择性好, 渗度大, 容量低, 可用较弱的缓冲淋洗液, 具有装柱方便, 柱寿命长、pH 范围较宽等优点。因此, 我们采用日立 2618 阳离子交换树脂柱, 以 0.005M 磷酸二氢钾溶液 (pH5) 作淋洗液, 用高效液相色谱分离测定粗制核黄素制剂中微量抗坏血酸。结果见图 1。

校正曲线的绘制: 以 0.1 微克/微升的抗坏血酸标准溶液, 吸取不同量进行色谱测定, 然后按峰面积 (积分值) 绘制抗坏血酸浓度校正曲线。当抗坏血酸浓度在 0.9 微克时呈直线关系, 因此测定样品时取样量应使抗坏血酸浓度不超出标准曲线的范围。测定结果见表 1。

表 1 粗制核黄素制剂中抗坏血酸的分析

样品批号含量 ($\mu\text{g/g}$) 实验 次数	1	2	3	4	5
1	182.0	181.4	173.1	185.5	173.1
2	—	173.0	171.2	170.6	175.6
3	187.2	192.8	186.5	187.1	—
平均值	184.6	182.4	176.9	181.2	174.4
标准偏差土	± 3.7	± 9.9	± 8.3	± 9.2	± 1.8
变异系数(%)	2.0	5.5	4.7	5.1	1.0