

# 大鼠脑突触质膜糖皮质激素结合位点的等电点测定

傅红 郭佐 陈宜张

(第二军医大学生理学教研室, 上海 200433)

## 提 要

利用离子交换层析法测定了大鼠脑突触质膜糖皮质激素结合位点的等电点。结果表明,膜糖皮质激素结合位点的等电点为5.5,与细胞内糖皮质激素受体的等电点( $pI$ 6.7)不同。

**关键词** 突触质膜,皮质酮,膜糖皮质激素结合位点

长期以来,人们普遍认为甾体激素通过与其细胞内的受体结合,进而影响DNA转录并发挥其重要的调节功能。随着研究的深入与发展,越来越多的事实表明,在某些细胞的细胞膜上也有甾体激素的特异结合位点<sup>[1-5]</sup>,它们可能介导甾体激素的一些快效应(潜伏期为数秒至数分钟)<sup>[6,7]</sup>。由于这方面的工作刚开展,目前对甾体激素膜受体的理化性质所知甚少。本实验室近几年就糖皮质激素对神经元细胞膜的电生理效应作了一些研究<sup>[7-9]</sup>,对大鼠脑突触质膜糖皮质激素结合位点的理化性质也进行了探讨<sup>[10]</sup>,但未测定其等电点。本文报道利用离子交换层析法测定大鼠脑突触质膜糖皮质激素结合位点(GCMBS)等电点的结果。

## 1 材料与方 法

1.1 实验动物 Sprague Dawley 大鼠由本校动物中心提供。

1.2 试剂和仪器 皮质酮为Sigma产品。<sup>[3]H</sup>皮质酮:中国科学院上海原子核研究所放射比度为1.39TBq/mmol(38Ci/mmol),放射纯度大于95%。DEAE-52纤维素(DE-52)和磷酸纤维素(PC-11):Whatman进口分装。TritonX-100:Rohm-Haas进口分装。pH-2S型数显酸度计为上海东升技术工程公司与上海

群益仪器厂联合制造。FJ-2108液体闪烁计数器:西安741工厂。DE-52层析的样品缓冲液:50mmol/L Tris-HCl,1% Triton X-100,pH分别为5.25,5.50,5.75,6.0,6.50,7.0;起始缓冲液:50mmol/L Tris-HCl,pH与样品缓冲液一致,分别为5.25,5.50,5.75,6.0,6.50,7.0;洗脱缓冲液:50mmol/L Tris-HCl,0.4mol/L NaCl,pH与样品缓冲液一致,分别为5.25,5.50,5.75,6.0,6.50,7.0。PC-11层析的样品缓冲液:20mmol/L磷酸缓冲液,1% Triton X-100,pH分别为5.25,5.50,5.75;起始缓冲液:20mmol/L磷酸缓冲液,pH与样品缓冲液一致,分别为5.25,5.50,5.75;洗脱缓冲液:20mmol/L磷酸缓冲液,0.4mol/L NaCl,pH与样品缓冲液一致,分别为5.25,5.50,5.75。

1.3. DE-52的转型 DE-52先用15倍(V/W)的0.5mol/L NaCl浸胀30min,再依次用0.5mol/L HCl,0.5mol/L NaCl-0.5mol/L NaOH各处理一次,每次都用大量蒸馏水洗至中性,最后用起始缓冲液平衡。

1.4. PC-11的转型 适量的PC-11通过倾泻法用蒸馏水洗涤3次,然后依次用0.5mol/L NaOH,0.1mol/L H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>各处理一次,每次都用大量蒸馏水洗至中性,最后用起始缓

冲液平衡。

1.5 突触质膜的制备 采用本实验室郭佐博士的改良方法。所有溶液均预先冷至 0—4℃。每 200 g 体重大鼠腹腔注射约 1ml 1% 戊巴比妥钠麻醉, 剪开胸腔, 自心尖部插入一塑料导管直至主动脉, 剪开左、右心耳, 用注射器注入冷生理盐水将血液冲出, 每只大鼠约灌注 200—250ml, 直至流出的灌注液清亮为止。剪下鼠头, 揭开头骨, 取出脑组织及垂体, 置于塑料片上, 弃去脑干部分, 将脑组织剪碎并装入玻璃匀浆管, 加入约 10 倍体积的 0.32mol/L 蔗糖, 匀浆后, 先经 1500g 离心 10min, 弃沉淀; 上清再经 10000g 离心 20min, 弃上清; 将沉淀混悬于 10mmol/L Tris-HCl (pH7.40) 中, 重复前一步骤 (10000g, 20min) 2 次; 最后经不连续蔗糖密度梯度超离心 (90000g, 90min), 收集滞留在 1.0mol/L 和 1.2mol/L 蔗糖交界面处的突触质膜成分; 用约 60 倍体积的样品缓冲液悬浮, 经 30000g 离心 10min, 弃上清, 用样品缓冲液悬浮, 重复前一步骤 1 次, 沉淀(突触质膜)用于层析。

1.6 DE-52 层析 用样品缓冲液混悬突触质膜使其总体积为 0.8ml, 其中 A 管(总结合管) 0.4ml 中加入 [<sup>3</sup>H] 皮质酮(终浓度为 100 nmol/L), B 管(非特异结合管) 0.4ml 中除加入 [<sup>3</sup>H] 皮质酮(终浓度为 100nmol/L) 外, 同时还加入比 [<sup>3</sup>H] 皮质酮高 1000 倍浓度的非标记皮质酮(终浓度为 100 μmol/L)。A 管和 B 管同时于 37℃ 温育 1h 后上样。经转型处理后的 DE-52 装入 10mm × 100mm 的玻璃层析柱中, 其中 DE-52 的体积为 2ml, 使用前用起始缓冲液充分平衡。上样后先用 60ml 起始缓冲液冲洗(流速约为 1ml/min), 弃去穿过峰; 再用洗脱缓冲液洗脱 GCMBS (流速约为 0.5 ml/min), 顺序收集 2ml × 10 管, 每管取 0.2 ml 并加闪烁液 3ml, 次日液闪计数。以洗脱体积为横坐标, [<sup>3</sup>H] 皮质酮的结合量 (cpm) 为纵坐标作图。

1.7 PC-11 层析 除所用的缓冲液不同外, 层析的方法与步骤均同 DE-52 层析。

2 结果与讨论

从图 1 和图 2 可看出, 在 pH 5.25 时, GCMBS 能与 PC-11 结合(图 1) 而不与 DE-52 结合(图 2), 说明此时 GCMBS 带有正电荷, 其等电点大于 5.25。

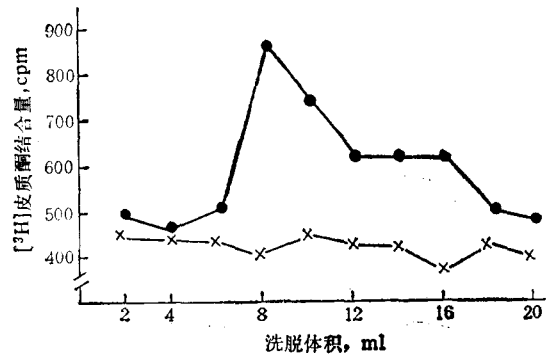


图 1 PC-11 层析突触质膜 (pH 5.25)  
●—●: A 管(总结合管)内含 100nmol/L [<sup>3</sup>H] 皮质酮  
×—×: B 管(非特异结合管)内含 100nmol/L [<sup>3</sup>H] 皮质酮和 100 μmol/L 非标记皮质酮

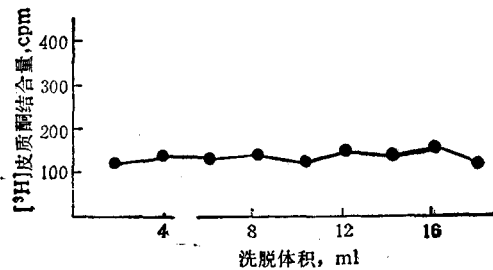


图 2 DE-52 层析突触质膜 (pH 2.25)  
●—●: A 管内含 100nmol/L [<sup>3</sup>H] 皮质酮

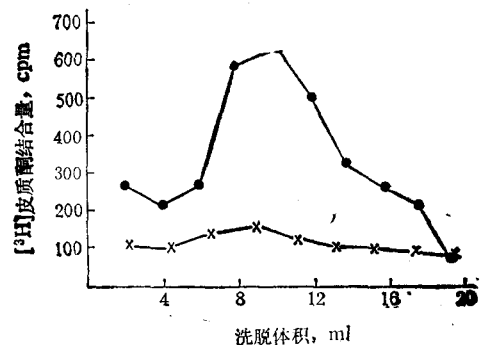


图 3 DE-52 层析突触质膜 (pH 5.75)  
●—●: A 管内含 100nmol/L [<sup>3</sup>H] 皮质酮  
×—×: B 管内含 100nmol/L [<sup>3</sup>H] 皮质酮和 100 μmol/L 非标记皮质酮

从图3和图4可看出,在 pH 5.75 时, GCMBS 能与 DE-52 结合(图3)而不与 PC-11 结合(图4),说明此时 GCMBS 带有负电荷,其等电点小于 5.75。

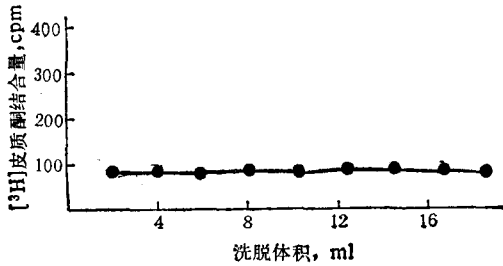


图4 PC-11 层析突触质膜 (pH5.75)

●—●: A 管内含 100nmol/L [<sup>3</sup>H] 皮质酮

从图5和图6可看出,在 pH 5.50 时, GCMBS 既不与 DE-52 结合(图5)也不与 PC-11 结合(图6),说明此时 GCMBS 不带电荷或所带电荷极少,用层析法显示不出来,提示 GCMBS 的等电点在 5.5 左右。

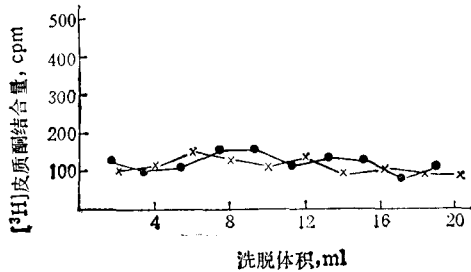


图5 DE-52 层析突触质膜 (pH5.50)

●—●: A 管内含 100nmol/L [<sup>3</sup>H] 皮质酮  
×—×: B 管内含 100nmol/L [<sup>3</sup>H] 皮质酮和 100μmol/L 非标记皮质酮

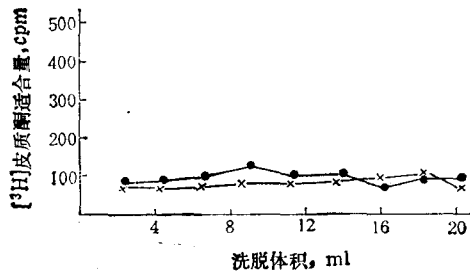


图6 PC-11 层析突触质膜 (pH5.50)

●—●: A 管内含 100 nmol/L [<sup>3</sup>H] 皮质酮  
×—×: B 管内含 100 nmol/L [<sup>3</sup>H] 皮质酮和 100μmol/L 非标记皮质酮

图7为同一批制备的突触质膜分成三等份 (pH 分别为 6.0, 6.50 和 7.0), 都加同样量的

[<sup>3</sup>H] 皮质酮(终浓度为 100nmol/L), 同时温育、层析后所测得的结果。它表明随着 pH 在高于等电点一侧逐渐加大, GCMBS 所带的负电荷逐渐增多, GCMBS 与 DE-52 结合的量也依次增加。根据上述实验结果, 我们认为大鼠脑突触质膜糖皮质激素膜结合位点的等电点为 5.5。

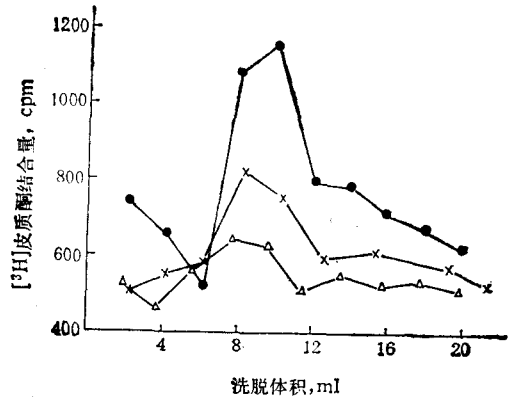


图7 DE-52 层析突触质膜

●—●: pH7.0; ×—×: pH6.50; ▲—▲: pH6.0

目前多数人采用凝胶等电点聚焦电泳法测定蛋白质的等电点,此法因受多种因素影响,加之所用试剂价格昂贵,故使用不甚方便。根据溶液 pH 值大小直接影响蛋白质和离子交换剂束缚力的原理, Yang<sup>[10]</sup> 报道了一种等电点测定方法。赵永芳<sup>[11]</sup> 等参考 Yang 的方法,对饭缸豆凝集素的等电点进行了测定,他们的结果表明,用离子交换层析法测定蛋白质的等电点,快速、准确 (< 0.2pH 单位),成本低。

细胞内糖皮质激素受体 (GR) 与配基结合后,经过加热(25°C, 30min), 稀释,高离子强度等处理,便由原来表面带负电荷的 DNA 非结合型活化成表面带正电荷的 DNA 结合型。活化后 GR 的等电点增大。Litwack<sup>[12,13]</sup> 等用等电聚焦电泳法测定的活化 GR 的等电点为 6.7, 而大鼠脑突触质膜与皮质酮在 37°C 温育 1h 后, GCMBS 的等电点为 5.5, 远远小于活化 GR 的等电点,说明糖皮质激素在膜上的结合位点与其在细胞内的受体不完全相同。当然它们之间的差异还不仅限于此,本实验室的研究表明: 两者的一些其它理化性质,如温度

稳定性,二价阳离子对结合活性的影响等也有所不同。

有关甾体激素膜结合位点(膜受体?)的理化性质报道极少,目前还很难将它提纯,在这种情况下,用等电点聚焦电泳法测其等电点有一定困难。我们用离子交换层析法测定了大鼠脑突触质膜糖皮质激素膜结合位点的等电点,也为初步纯化 GCMBS,从而进一步研究其理化性质,加深对它的了解奠定了一定基础。

### 参 考 文 献

- 1 Allera A, Rao G S, Breuer H. *J Steroid Biochem*, 1980; 12: 259
- 2 Towle A C, Sze P Y. *J Steroid Biochem*, 1983; 18: 135

- 3 Savart M, Cabillic Y. *Biochim Biophys Acta*, 1985; 813: 87
- 4 Koch B, Lutz-Bucher B, Briaud B *et al.* *J Endocrinol*, 1978; 79: 215
- 5 Fant M E, Harbison R D, Harrison R W. *J Biol Chem*, 1979; 254: 6218
- 6 Keller-Wood M E, Dallman M F. *Endocrine Rev*, 1984; 5: 1
- 7 Hua S Y, Chen Y Z. *Endocrinol*, 1989; 124: 687
- 8 巫凌刚,陈宜张. *中国药理学报*, 1989; 10: 306
- 9 顾勤,邢宝仁,夏金辉,陈宜张. *生理学报*, 1990; 42: 476
- 10 Yang V C, Langer R. *Anal Biochem*, 1985; 147: 148
- 11 赵永芳,周济兰,叶明. *生物化学与生物物理进展*, 1988; 15: 470
- 12 Litwack G, Filler R, Rosenfield S A *et al.* *J Biol Chem*, 1973; 248: 7481
- 13 Parchman L G, Litwack G. *Arch Biochem Biophys*, 1977; 183: 374

## 用过碘酸氧化试验鉴定单抗抗糖表位特性

梅筠·苏新·李红

(军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京 100850)

### 提 要

过碘酸在酸性条件下能氧化糖蛋白中糖的连羟基而不改变多肽链结构。将这一特性与 ELISA 或免疫印迹试验结合起来建立了检测单抗是否抗糖表位的方法。

**关键词** 单抗,碳水化合物,糖蛋白,糖脂,过碘酸

过碘酸在酸性条件下能氧化糖蛋白中糖的连羟基而不改变多肽链结构<sup>[1]</sup>。Woodward等<sup>[2]</sup>利用这一特性建立了检测单克隆抗体是否抗糖表位的方法。作者将此法加以改进,降低了免疫印迹试验的本底,显色更加清晰,提高了酶联免疫吸附测定法的(ELISA)灵敏度。

### 1 材 料 和 方 法

#### 1.1 酶联免疫吸附测定(ELISA)

1.1.1 戊二醛处理酶标板<sup>[3]</sup> 用含 0.1% 戊二醛的包被液(0.05mol/L pH9.6 碳酸盐液)室温下处理酶标板 1h(100 $\mu$ l/孔),弃去,再用不含戊二醛的包被液(pH9.6)洗板 3 次,甩干

后直接用于包被。

1.1.2 ELISA 用福氏 2a 痢疾杆菌经水萃取后的可溶性蛋白 4 $\mu$ g/ml 包被(100 $\mu$ l/孔),4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。次日用洗液(0.01mol/L pH 7.4 PBS-Tween 20)室温浸泡 30min,洗板 5 次,用醋酸钠缓冲液(50mmol/L pH4.5)轻洗后,加入用醋酸钠缓冲液配制的不同浓度的过碘酸(0~20mmol/L) 100 $\mu$ l/孔,室温避光 1h。用醋酸钠缓冲液轻洗后加入用 pH 7.4 0.01 mol/L PBS 液配制的 50 mmol/L 硼氢化钠 100 $\mu$ l/孔,室温作用 30min,以阻止过碘酸对醇羟基的氧化而形成过多的醛基,以及非