科学通报
第40卷 第23期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1995年12月

大鼠膈肌β-银环蛇毒素结合蛋白的部分纯化及其鉴定

沈国光 卓晓亮 张新妹 徐 科
(中国科学院上海生理研究所，上海 200031)

关键词 β-银环蛇神经毒素 β-银环蛇神经毒素结合蛋白 大鼠膈肌

β-银环蛇神经毒素(β-bungarotoxin; β-BuTX)是从银环蛇毒分离得到的一种由两个亚基构成的碱性蛋白．与其它β-神经毒素一样，它作用于神经肌肉接头，选择地抑制神经递质乙酰胆碱的释放[1]．在中枢神经系统，这种毒素表现出既作用于胆碱能也作用于GABA能等神经元的细胞毒性[2]．电生理研究资料表明，β-BuTX可能结合并阻断突触前的A型K^+通道[3]，因此我们利用这种毒素作为探针，进行毒素结合蛋白的分离纯化工作，将可能有益于对突触前的离子通道结构与功能的探索，以增进有关突触递质释放机制的知识．文献报道，从小鸡脑突触体抽提并初步纯化了β-BuTX的结合蛋白．由于这种结合蛋白与β-BuTX的结合可受另外两种K^+通道配体的抑制，推测被纯化的蛋白是K^+通道的一种[4]．我们认为β-BuTX在神经肌肉接头处的作用位点有更高的特异性，所以从神经肌肉组织分离该结合位点具有重要的意义．我们曾测定了大鼠膈肌膜组分中β-BuTX结合蛋白的一些结合性质，得知大鼠膈肌膜组分中该结合蛋白的密度相对较高[5]．本文报告了我们从大鼠膈肌膜的增溶抽提液层析纯化β-BuTX结合蛋白的工作．

1 材料与方法

1.1 大鼠膈肌膜组分的制备

方法基本上如文献[5]所述，将15只S.D.大鼠(体重约200 g)断头处死，迅速剖腹取出膈肌，在冰浴上剪去中央腱和附带的脂肪．切碎，在45 mL缓冲液A(20 mmol/L K-Hepes, pH 7.4; 60 mmol/L KCl; 1 mmol/L PMSF; 0.01% NaN_3及适量的蛋白酶抑制剂)中用Polytron匀浆器进行匀浆．匀浆液经17 000×g高速离心30 min后，弃去上清液，沉淀团粒重新悬浮于27 mL缓冲液A中．此重悬液即大鼠膈肌质膜制备物．除非特别注明，整个实验操作过程都在4℃下进行．

1.2 去垢剂增溶抽提液的制备

用浓KCl溶液和20% Triton X-100把上述膜制备物中KCl和Triton X-100的终浓度分别调到0.4 mol/L和1.5%，在4℃下缓缓搅拌2～3 h，进行增溶抽提．抽提后加2倍体积的缓冲液B(20 mmol/L K-Hepes; 1 mmol/L PMSF; 0.01% NaN_3; 0.5% Triton X-100;

1995-03-10收稿，1995-06-18收修改稿

0.125% 大豆磷脂及适量的蛋白酶抑制剂) 稀释, 再以 47 000×g 高速离心 1 h. 此上清液即去垢剂抽提液. 用 Bradford 方法测定蛋白质浓度, 以牛血清白蛋白为标准.

1.3 大鼠膈肌 β-BuTX 结合蛋白的纯化

上述增溶抽提液用缓冲液 B 再稀释一倍, 将其 KCl 浓度调至 67 mmol/L, 上 DEAE Sepharose CL 6B 离子交换层析柱 (1×20 cm), 循环过夜, 流速 35 mL/h. 层析柱事先经缓冲液 C(缓冲液 A 中含 1 mmol/L $CaCl_2$; 5 mmol/L $MnCl_2$; 0.5% Triton X-100 和 0.125% 大豆磷脂) 平衡. 上样后以 50 mL 缓冲液 C 洗涤柱, 再分别用含 100 mmol/L; 400 mmol/L; 600 mmol/L KCl 的缓冲液 C 进行分步洗脱, 流速 14 mL/h. 以每管 1 mL 分部收集洗脱液. 测定各管收集液的结合活力, 合并活性洗脱峰.

2 mL 小扁豆凝集素 (lentil lectin) Sepharose 4B 亲和层析凝胶经缓冲液 C 平衡后与上述 DEAE 柱洗脱液在旋转混合器上反应过夜. 装柱后用 40 mL 缓冲液 C 洗涤, 再用缓冲液 C 配制的 0.3 mol/L 甲基甘露糖苷溶液洗脱结合蛋白, 流速 1 ml/h, 每管 0.5 mL 分部收集.

1.4 同位素 ^{125}I 标记银环蛇神经毒素

采用 Hunter 和 Greenwood 的氯胺 T 法制备 ^{125}I-β-BuTX. 反应在 pH 7.5 的磷酸钠缓冲液中进行, 总体积为 200 μL, 含 β-BuTX 100 ~ 500 μg, $Na^{125}I$ 1 ~ 7 3.7×10^{10} mBq, 加入氯胺 T 200 μg 后反应 2 min. 以 600 μg 偏重亚硫酸钠终止反应, 并加入载体 KI 20 mg. 反应混合液上 Sephadex G15 层析住 (1 cm×20 cm) 分离 ^{125}I-β-BuTX 和游离的 $^{125}I^-$. ^{125}I 标记的 β-BuTX 的比放射活性为 5 ~ 25 3.7×10^{10} mBq/mg 毒素蛋白.

1.5 ^{125}I-β-BuTX 与大鼠肺肌 β-BuTX结合蛋白的结合实验

将小扁豆凝集素亲和层析柱的洗脱液 20 μL(含 0.56 μg 蛋白) 与同位素 ^{125}I 标记的 β-BuTX(浓度为 0.3 ~ 6 nmol/L) 在室温下孵育 20 min 进行结合反应. 反应介质为含有 1 mmol/L $CaCl_2$; 5 mmol/L $MnCl_2$; 0.1% 牛血清白蛋白的缓冲液 A, 总体积为 200 μL. 在上述反应液中含有或不含相当于同位素标记毒素浓度 200 倍的过量冷 β-BuTX, 可分别测定同位素标记毒素与层析柱洗脱液的非特异性结合量和总结合量. 而后将反应液置冰浴中, 加入 100 μL 饱和硫酸铵溶液沉淀蛋白. 经玻璃纤维滤膜 Whatman GF/C(直径 25 mm) 真空抽滤, 再用 2×5 mL 25% 硫酸铵溶液洗涤. 最后将滤膜置 γ 计数器中测定放射性计数.

大鼠膈肌 β-BuTX 结合蛋白的分离、纯化各步, 即膜组分、去垢剂抽提物、DEAE 离子交换层析洗脱液等的结合活力的测定都采用上述相同的方法.

1.6 材料与试剂

实验用 S.D. 大鼠由中国科学院上海实验动物中心提供. 同位素产品 $Na^{125}I$ 购于中国科学院北京原子能研究所, 其放射性浓度为 140 mCi/mL. 层析材料 DEAE Sepharose CL 4B 和 Lentil-lectin Sepharose 4B 是 Pharmacia 公司产品. 玻璃纤维滤膜 GF/C 是 Whatman 公司产品. β- 银环蛇神经毒素、Hepes 及数种蛋白酶抑制剂购于 Sigma 公司. PMSF 是 Marck 公司产品. 其它各种试剂为国产分析纯或保证试剂.

2 结果与讨论

2.1 大鼠膈肌 β-BuTX 结合蛋白的去垢剂抽提及层析纯化

从大鼠膈肌膜组分增溶抽提 β-BuTX 结合蛋白, 采纳了 Schmidt 和 Betz 从小脑抽提

β-BuTX 结合蛋白的一些条件[6]，结果表明，较高的 K 离子浓度(0.4 mol/L)和去垢剂 Triton X-100 浓度(1.5%)是有效的，总结合活力的得率在 50%～70% 以上，抽提液的比结合活性为 200～400 fmol/mg 蛋白.

而后对增溶抽提的大鼠膈肌 β-BuTX 结合蛋白的纯化做了一些尝试. 我们采用两步层析: 第一步是阴离子交换层析; 第二步是植物凝集素亲和层析. 原本是想通过 DEAE 柱层析浓缩抽提液(体积达 200 mL 以上)，但结果显示，这一步也有较好的分离效果. 上柱液的 KCl 浓度为 67 mmol/L. 分步洗脱时大部分蛋白质(约 80%)在 400 mmol/L KCl 这一步被洗脱下来，但其比结合活性接近零. 而先于此在 100 mmol/L KCl 洗脱下来的蛋白只占被吸附总蛋白量的 10% 左右，却具有很高的比结合活性(约 5 pmol/mg 蛋白). 这样，第一步离子交换层析分离后产物的比结合活力，便已与文献中鸡脑的 β-BuTX 结合蛋白抽提液经三步亲和层析纯化后最终达到的数量级(5～14 pmol/mg 蛋白)相当[4].

第一步层析分离的产物经小扁豆凝集素(lentil lectin)亲和层析进一步纯化后，所得产物与 ^{125}I-β-BuTX 的比结合活力又提高了约 20 倍，达到 90～120 pmol/mg 蛋白. 这个数值与期望的纯结合蛋白的比活力还相差约一个数量级. 为了分析该结合蛋白的多肽组成及氨基酸顺序，尚需进一步的努力. 本实验纯化各步的数据列于表 1.

表 1　β-银环蛇神经毒素结合蛋白的纯化

纯化步骤	总蛋白量/mg	总结合活性/pmol	比结合活性/pmol · mg^{-1}	得率(%)	纯化倍数
膜制备物	320	70.4	0.22	100	1
去垢剂抽提液 离子交换	118	51.9	0.44	74	2
层析柱洗脱液	5	27	5.4	38	25
小扁豆凝集素 亲和柱洗脱液	0.098	9.7	99	14	450

2.2　层析纯化的大鼠膈肌 β-BuTX 结合蛋白的结合性质分析

我们曾试图从小牛膈肌分离 β-BuTX 结合蛋白，但得率较低. 后发现大鼠膈肌是一种更为合适的材料. 本工作中层析纯化的大鼠膈肌 β-BuTX 结合蛋白与 ^{125}I-β-BuTX 的结合实验数据的 Scatchard 分析表明(见图 1)，结合位点的平衡解离常数 K_D 值为 4.9×10^{-9} mol/L. 这与膈肌膜制备物的 K_D 值 6.4×10^{-9} mol/L 十分接近[5]，说明经去垢剂增溶抽提和亲和层析分离等处理后结合位点与 β-BuTX 的亲和力未受实质性影响. 结合实验数据的Hill分析又显示，Hill 系数为 0.96，接近 1(见图 2). 这也与膜制备物的情况一样，即在实验浓度范围内，结合位点与 β-BuTX 的作用未表现出协同性.

虽然已有的电生理研究资料表明，β-BuTX 和另外两种神经毒素，即曼巴蛇毒素(dendrotoxin)和肥大细胞脱颗粒肽(MCD peptide)都作用于突触前的 A 型 K^+ 通道[3, 7]，但从这些配体与 K^+ 通道的结合和它们之间的抑制行为，以及它们结合位点在鼠脑中的不同分布看[8]，A 型 K^+ 通道可能尚有亚型. 目前，我们正在进行将纯化的 β-BuTX 结合蛋白在人工脂膜上重建后测定其 K^+ 通道功能的实验，并已得到初步肯定的结果. 鸡脑的 β-BuTX 结合蛋白 K_D 值为 0.5～2 nmol/L[4, 6]，而大鼠膈肌的 β-BuTX 结合蛋白 K_D 值为 4～6 nmol/L，不知两者是否可能属于这个家族中的不同成员.

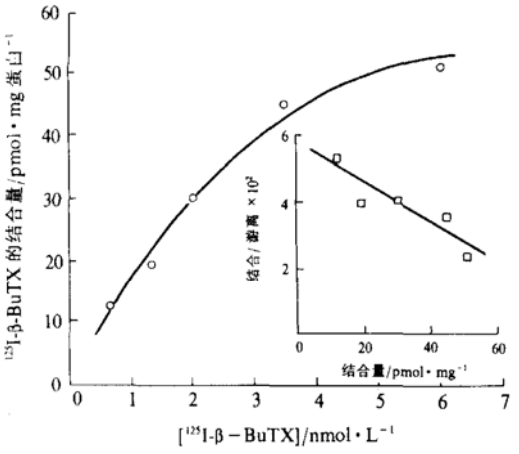

图1 部分纯化的大鼠膈肌β-BuTX结合蛋白与^{125}I-β-BuTX的结合曲线

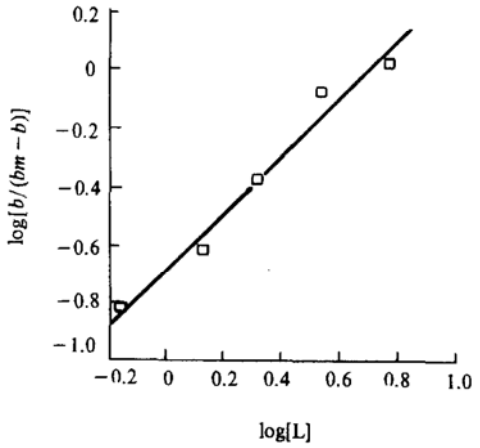

图2 ^{125}I-β-BuTX与纯化的大鼠膈肌β-BuTX结合蛋白结合作用的Hill图

β-BuTX是被研究得最多的一种突触前神经毒素，但包括它在内的多种β-神经毒素结合位点的鉴定和分离迄今似乎仍局限于脑突触体的来源．神经肌肉接头已被证实是多种蛇毒神经毒素天然的攻击目标，从神经肌肉组织，如膈肌，分离得到的结合位点应有较高的特异性，这有利于对这些结合位点的结构和性质研究．本工作中经亲和层析纯化的大鼠膈肌β-BuTX结合蛋白制品的比结合活性较文献中鸡脑来源的结合蛋白制品高10倍．我们希望得到进一步的纯品，以便进行结构组成分析．

参 考 文 献

1 Abe T, Alema S, Miledi R. Isolation and characterization of presynaptically acting neurotoxins from the venom of Bungarus snakes. Eur J Biochem, 1977, 80(1): 1～12

2 Halliwell J V, Dolly J O. Preferential action of β-bungarotoxin at nerve terminal regions in the hippocampus. Neurosci Lett, 1982, 30(3): 321～327

3 Dreyer F, Penner R. The action of presyaptic snake toxins on membrane currents of mouse motor nerve terminal. J Physiol, 1987, 386: 455～463

4 Schmidt R R, Betz H. The β-Bungarotoxin-binding protein from chick brain: binding sites for different neuronal K^+ channel ligands co-fractionate upon partial purificaton. FEBS Lett, 1988, 240(1, 2): 65～70

5 沈国光，张新妹，徐 科．大鼠膈肌来源的β-银环蛇毒素结合蛋白的一些结合性质．科学通报，1995, 40(14): 1 322～1 325

6 Rehm H, Betz H. Solubilization and characterization of the β-bungarotoxin-binding protein of chick brain membranes. J Biol Chem, 1984, 259(11): 6 865～6 869

7 Stansfeld C E, Marsh S J, Parcej D N *et al*. Mast cell degranulating peptide and dendrotoxin selectively inhibit a fast-activating potassium current and bind to common neuronal proteins. Neurosci, 1987, 23(3): 893～902

8 Sequier J M, Brennand J, Barhanin J *et al*. Regional expression of a MCD-peptide and dendrotoxin I-sensitive voltage-dependent potassium channel in rat brain. FEBS Lett, 1990, 263(1): 163～165