科学通报
第40卷 第14期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1995年7月

大鼠膈肌来源的β-银环蛇毒素结合蛋白的一些结合性质*

沈国光 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

从毒蛇毒纯化的一类选择地阻遏乙酰胆碱(ACh)从运动神经末梢释放的神经毒素，即β型蛇神经毒素，被认为是分析研究神经递质释放机制的十分有用的工具[1~3]. β-银环蛇神经毒素(β-bungarotoxin; β-BuTX)便是其中被研究得比较多的一种，其分子量约21 000ku，由共价相连的2条不同的肽链构成[3,4]. β-BuTX在外周神经系统中对运动神经末梢的释放过程有高度的选择性阻遏作用[5]，但在中枢神经系统中除阻遏胆碱能突触传递外，尚作用于γ-氨基丁酸(GABA)能等神经元[6]. 据文献报道，已有作者鉴定了这种毒素在大鼠和鸡的脑中的结合蛋白，这类结合位点的亲和力强(K_D值的数量级为nmol/L)，在组织中的密度则较低(每毫克膜蛋白含100fmol左右)[7,8]. 鉴于β-BuTX对外周接头的高度选择性，我们认为探讨外周神经系统中β-BuTX结合蛋白的特性应是重要而有意义的. 我们曾测过β-BuTX与大鼠膈肌增溶液的结合性质. 本工作对实验方法又做了一些摸索和改进，使之适用于膈肌膜组分，本文即报道用同位素^{125}I标记的β-BuTX与大鼠膈肌质膜的粗制备物进行结合实验的结果.

1 材料与方法

1.1 大鼠膈肌匀浆离心团粒的制备

将3只SD大鼠(250g左右)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，加10 mL缓冲液A(20 mmol/L K-Hepes pH7.4, 60 mmol/L KCl, 1 mmol/L PMSF, 0.01%NaN_3)，在冰浴中用Polytron匀浆器进行匀浆，打3次，每次1min. 匀浆液经细尼龙网过滤，以去除纤维状结缔组织. 然后以平均离心力17 000×g，高速离心30min. 弃去上清液. 离心所得沉淀团粒呈灰白色，用特氟隆-玻璃匀浆器将其分散重新悬浮于11mL的缓冲液A中. 此离心团粒的重悬液即用于结合实验的大鼠膈肌匀浆的膜组分的粗制品，一部分立即进行下一步实验，另一部分经分装，冻存于−70℃低温冰箱中待用. 经试验，冻存的样品在2周内结合活力无明显改变.

1.2 同位素^{125}I标记的β-BuTX的制备

我们采用Hunter和Greenwood的氯胺T法制备^{125}I-β-BuTX. 反应在磷酸钠缓冲液中进

1994-08-22收稿，1995-02-28收修改稿
*国家"攀登"计划基金资助项目

行，总体积为 200 μL，含β-BuTX 100～500μg，$Na^{125}I$ 40～250MBq，加入氨胺 T 200μg 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 柱 (1×20 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 185～925 mBq/mg 毒素蛋白. 本实验中蛋白质含量的测定采用 Bradford 方法，以牛血清白蛋白为标准蛋白.

1.3 ^{125}I-β-BuTX 与大鼠膈肌质膜粗制品的结合实验

将大鼠膈肌膜组分的重悬液 100 μL(969 μg 蛋白) 与同位素 ^{125}I 标记的 β-银环蛇神经毒素 (浓度为 0.25～5.6 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 $MnCl_2$,0.2%BSA 的缓冲液 A, 总体积为 400 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 100 倍的过量冷 β-BuTX, 可分别测定同位素标记毒素与膜组分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 200 μL 饱和硫酸铵溶液，再经玻璃纤维滤膜 Whatman GF/A(直径 25 mm) 真空抽滤，用 2×5 mL25% 硫酸铵溶液洗涤滤膜. 最后将滤膜置 γ 计数器中测定放射性计数.

1.4 未标记 β-BuTX 对 ^{125}I-β-BuTX 结合作用的平衡抑制实验

冷 β-BuTX 对 ^{125}I 标记毒素结合作用的平衡抑制实验与上节所述结合实验的方法和条件相同. 反应液中含 100 μL 膜组分重悬液，^{125}I-β-BuTX 的浓度为 3.82 nmol/L, 未标记 β-BuTX 的浓度从 0 增加至 202 nmol/L, 即冷毒素与 ^{125}I 标记毒素浓度之比从 0 逐步增加至 53.

1.5 材料与试剂

实验用 SD 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 5 200 MBq/mL. 玻璃纤维滤膜 GF/A 为 Whatman 公司产品. β-银环蛇神经毒素、Hepes 为 Sigma 公司产品. PMSF 是 Merck 公司产品，其它试剂为国产分析纯试剂.

2 结果与讨论

2.1 ^{125}I 标记的 β-BuTX 与大鼠膈肌匀浆膜组分的结合

在同位素 ^{125}I 标记的 β-BuTX 与大鼠膈肌膜组分的结合实验中，特异性结合量由总结合量与非特异性结合量之差计算而得. 根据实验数据绘制的结合曲线和 Scatchard 图表明，^{125}I-β-BuTX 与膈肌膜组分的结合具有特异性和可饱和性 (见图 1). 这一实验结果显示，大鼠膈肌膜组分中存在 ^{125}I-β-BuTX 的结合位点.

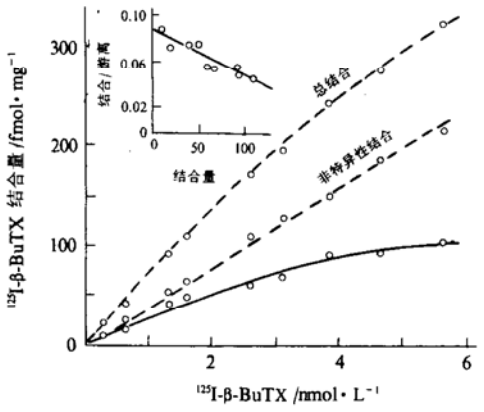

图 1 ^{125}I-β-BuTX 与大鼠膈肌膜组分的结合曲线
插图是 Scatchard 图. 图中数据是 3 次实验的平均值

我们用线性回归法处理 Scatchard 图，推算出 ^{125}I-β-BuTX 与其在大鼠膈肌中的结合位点作用的平衡解离常数 (K_D) 值为 6.4×10^{-9} mol/L. 在这种膈肌匀浆膜组分中结合位点的密度为 226 fmol/mg 膜蛋白. 这与文献中报道的在大鼠和鸡的中枢神经系统脑中的数据在数量级上是一致的[7,8]. 这表明大鼠膈肌的 β-BuTX 结合位点也具有亲和力强，密度低

的特点.

在结合实验分析方法上我们做了一些摸索. 在以前测定β-BuTX与大鼠膈肌的增溶液的结合性质时,曾采用了文献中在做脑的突触体膜组分的结合实验时,分离结合状态和游离的^{125}I标记毒素所采用的,聚氮丙啶(PEI)预浸玻璃纤维滤膜过滤方法,但结果偏低(65 fmol/mg膜蛋白)[9]. 文献中还采用过醋酸纤维素滤膜过滤和凝胶过滤柱层析等其它一些方法[6,8]. 我们的实验表明,这些方法对肌肉组织匀浆的结合实验都不很适合,主要问题是非特异性结合的本底过高. 本工作中采用的硫酸铵沉淀玻璃纤维滤膜过滤法,则基本上克服了这个困难. 这为我们分离、纯化大鼠膈肌的β-BuTX结合蛋白的工作取得更完整的分析数据提供了条件.

2.2 未标记β-BuTX对^{125}I标记毒素结合作用的抑制

平衡抑制实验的结果表明,当冷β-BuTX的浓度达到标记毒素的50倍以上时,绝大部分(98%以上)结合的标记毒素被冷毒素所取代(见图2). 将冷毒素浓度的对数对标记毒素结合的百分率作图,经线性回归法处理可得一直线(见图2的插图): $B(\%)=-41.2(\log \text{nmol/L})+$ $+91.2$, 式中B为标记毒素的结合百分率, log nmol/L是冷毒素浓度的对数. 其线性相关系数γ为-0.965. 当标记毒素的结合量中有50%被取代时,冷毒素的浓度,即$IC_{50}\approx 10\times10^{-9}$ mol/L. 根据公式

$$K_i=IC_{50}/(1+K_D),$$

计算可得平衡抑制常数为6.3×10^{-9}mol/L, 与平衡解离常数十分接近.

2.3 ^{125}I-β-BuTX与大鼠膈肌膜组分结合的Hill分析

根据结合实验的数据,将$\log[B/(B_m-B)]$对$\log[F]$作图,也可得一直线,此即所谓Hill图(见图3). 图中B是标记毒素的结合量,B_m是饱和结合量,F是标记毒素的浓度. 从图3可看出,结果呈明显的线性关系,其相关系数为0.989. 借此Hill直线的斜率,即Hill系数,可推断该结合过程的协同性. 图3直线的斜率为0.979, 接近1, 表明β-BuTX与其结合位点的结合过程中无协同作用. 在标记毒素的实验浓度范围内(数量级为nmol/L),在结合性质方面大鼠膈肌的结合位点应是一类单一的相互间无协同作用的膜蛋白.

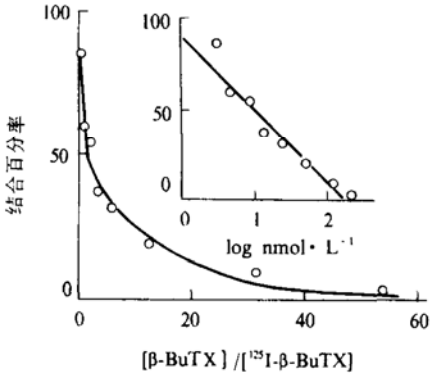

图2 β-BuTX对^{125}I-β-BuTX与大鼠膈肌膜组分结合作用的平衡抑制曲线

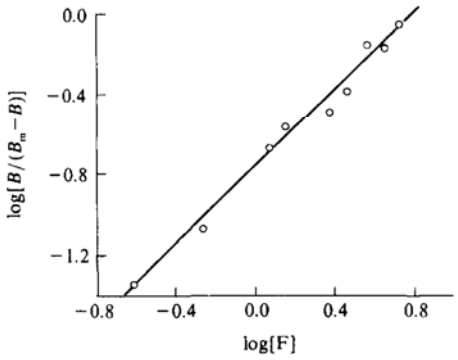

图3 ^{125}I-β-BuTX与大鼠膈肌膜组分结合的Hill图

据报道Betz实验室从鸡脑的突触体组分中部分纯化了β-BuTX结合蛋白,实际上得到的

是将组织匀浆与β-BuTX的比结合活性提高了大约300倍的产物[9]. 要真正得到纯的结合蛋白,还需将比结合活性再提高数百倍. 这项工作将是很困难的. 我们曾试图从牛膈肌中分离β-BuTX结合蛋白,但实验资料表明,牛膈肌组织匀浆的膜组分与β-BuTX的比结合活性较低(大约10 fmol/mg膜蛋白),比鸡脑组织低近一个数量级. 而本工作所测得的大鼠膈肌组织匀浆的膜组分中结合位点的密度则比鸡脑组织还相对高些(226 fmol/mg膜蛋白). 这为我们选用大鼠膈肌作为分离、纯化β-BuTX结合蛋白的实验材料提供了依据.

参　考　文　献

1 Fraenkel-Conrat H. Snake venom neurotoxins related to phospholipase A_2. J Toxicol Toxin Rev, 1982, 1: 205～221

2 Bon C, Radvanyi F, Saliou B *et al*. Crotoxin: a biochemical analysis of its mode of action. J Toxicol Toxin Rev, 1986, 5: 125～138

3 Howard B D, Gundersen C B. Effects and mechanisms of polypeptide neurotoxins that act pre-synaptically. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1980, 20: 307～336

4 Kondo K, Toda H, Narita K *et al*. Amino acid sequence of β_2-bungarotoxin from Bungarus multicinctus venom. The amino acid substitution in the B Chains. J Biochem, 1982, 91: 1 519～1 548

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

6 Rehm H, Schafer T, Betz H. β-Bungarotoxin-induced cell-death of neurons in chick retina. Brain Res, 1982, 250: 309～319

7 Othman I B, Spokes J W, Dolly J O. Preparation of neurotoxic ^{3}H-β-bungarotoxin: demonstration of saturable binding to brain synapses and its inhibition by Toxin I. Eur J Biochem, 1982, 128: 267～276

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

9 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 purification. FEBS Letters, 1988, 240: 65～70