

碘标神经毒素—乙酰胆碱受体复合物 对重症肌无力研究的初步应用

涂来慧 张仁琴

(第二军医大学附属一院 神经科)

乔志敏

(第二军医大学附属一院 生化室)

杨健

(第二军医大学附属一院 同位素室)

眼镜蛇神经毒素化学性质稳定,易于保存,用 ^{131}I 或 ^{125}I 标记,方法简便,比活性高,能专一性地与菸硷型乙酰胆碱受体结合,常作为一种分子探测器,用来研究蛇毒的毒理作用(杨钦照1977)、测定菸硷型乙酰胆碱受体的浓度,于临床还可以检测重症肌无力患者抗乙酰胆碱受体抗体(Lindstrom,1976; Lefvert 1978)。对研究神经肌接头的生理功能,阐明重症肌无力的发病机理,辅助诊断和观察疗效均有实际意义。

我们在重症肌无力的临床研究中,按Lefvert(1978)的方法作了改进,用氯胺T氧化法碘标眼镜蛇神经毒素,制备 ^{131}I 神经毒素—人横纹肌乙酰胆碱受体复合物(^{131}I —NT—AChR),测定重症肌无力患者乙酰胆碱受体抗体。现将 ^{131}I 眼镜蛇神经毒素的标记方法、性能鉴定以及其与乙酰胆碱受体结合试验的结果报告如下:

一、 ^{131}I 眼镜蛇神经毒素的标记方法及性能鉴定

(一) 标记

华南亚种眼镜蛇(*Naja naja atra*)神经毒素(由昆明动物研究所、广州军区总医院提供),200 μg 置尖底小玻管中,溶解于50 μl 磷酸缓冲液(0.05M, pH7.4),加50 μl 无载体 Na^{131}I (2~3 mCi)再喷注加入100 μl 氯胺T(100 μg),反应一分钟后立即加100 μl 偏重亚硫酸钠(800 μg),使反应终止,滴入10%KCl 2滴。

(二) 鉴定

1、SephadexG—25柱层析 取SephadexG—25 8g,装成0.8 \times 43cm的柱,用

0.05M, pH7.4磷酸缓冲液平衡, 加牛血清白蛋白液使凝胶柱先饱和吸附, 然后加 碘标眼镜蛇神经毒素原液, 用上述磷酸缓冲液洗脱, 速度为12—15滴/分, 每管收集0.5ml, 于第20管开始出现第一峰(为标记毒素峰), 第52管出现第二峰(为游离 ^{131}I 盐峰), 见图1。样品置4℃贮存备用。

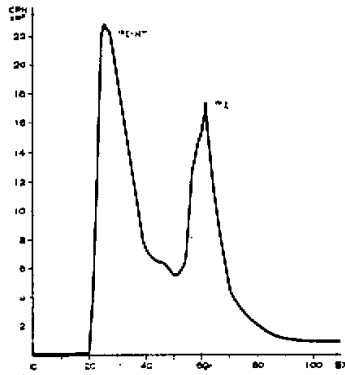


图1 ^{131}I 眼镜蛇神经毒素SephadexG—25柱层析图

2、纸层析及放射自显影 用Whatman I号滤纸上行层析, 展开液为正丁醇: 冰醋酸: 水(200:30:75)。10小时半, 展开液上行22cm。待纸干燥后放射自显影, 分段计数。见图2。可以确认第二峰为游离 ^{131}I , 第一峰为 ^{131}I 标记的眼镜蛇神经毒素。

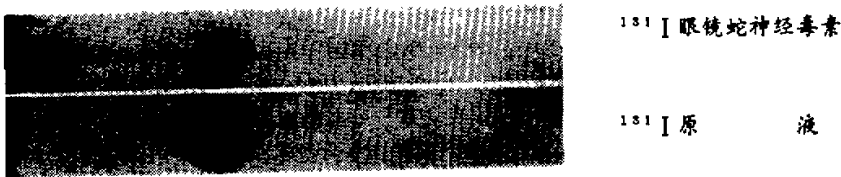


图2 ^{131}I 原液与 ^{131}I 眼镜蛇神经毒素纸层析自显影

由此求得Rf值: ^{131}I 眼镜蛇神经毒素为0, 游离 ^{131}I 为0.27。

依据下列公式计算:

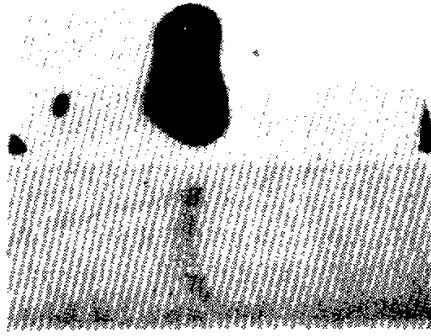
$$\text{标记率} = \frac{^{131}\text{I 眼镜蛇神经毒素 cpm}}{\text{纸层析带总的cpm}} \times 100$$

$$\text{比放射性} = \frac{\text{投入 } ^{131}\text{I } \mu\text{ci} \times \text{标记率}}{\text{投入眼镜蛇神经毒素 } \mu\text{g}}$$

结果, 标记率为80%, 比放射性为6 $\mu\text{ci}/\mu\text{g}$ 。

3、乙酸钠纤维素薄膜电泳及放射自显影 碘标眼镜蛇神经毒素用乙酸钠纤维素薄膜电泳。采用巴比妥缓冲液, pH8.2, 离子强度0.04。因眼镜蛇神经毒等电点为9.2, 故电泳

方向由阳极至阴极。电流0.7~0.8 mA/Cm 电压85V, 通电1.5~2小时。薄膜干后自显影。未碘标神经毒素采用同样方法电泳, 氨基黑染色作为对照, 结果见图3。碘标与未标神经毒素移行距离一致, 证明碘标物质为眼镜蛇神经毒素。

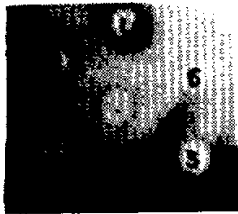


^{131}I 标眼镜蛇神经毒素
(放射自显影)

未碘标眼镜蛇神经毒素
(蛋白染色)

图3 未碘标与碘标眼镜蛇神经毒素乙酸纤维薄膜电泳图

4、双向扩散试验及放射自显影 用1%琼脂糖制板、中央孔加眼镜蛇抗毒血清(由上海生物制品研究所提供), 周围孔分别加 $1\mu\text{l}$ 碘标眼镜蛇神经毒素及不同稀释度的未碘标眼镜蛇神经毒素抗原, 37°C 温育24小时, 暗盒曝光三天后洗片, 显示有沉淀线(见图4), 证明碘标后眼镜蛇神经毒素仍保持其抗原活性。



中央孔 抗体原液 $1\mu\text{l}$

周围孔 以逆时针方向排列

^{131}I —NT 每孔 $1\mu\text{l}$ 。

NT O、50ng、100ng、200ng、
400ng、800ng。

图4 ^{131}I 眼镜蛇神经毒素及其抗血清
双向扩散放射自显影

5、火箭电泳及放射自显影 取 $5\times 7\text{cm}$ 玻片, 用1%琼脂糖含1:1600稀释度眼镜蛇抗毒血清制板, 打孔, 每孔加 $1\mu\text{l}$ 碘标眼镜蛇神经毒素及不同量的未标眼镜蛇神经毒素, 电泳缓冲液为巴比妥缓冲液pH8.2, 离子强度0.04, 电流75mA, 电压120V, 电泳时间8小时, 暗盒曝光3天后洗片, 显示火箭图象(见图5), 也表明碘标后眼镜蛇神经毒素有免疫活性。



800ng、400ng、200ng

图5 ^{131}I 眼镜蛇神经毒素火
箭电泳放射自显影

二、烟碱型乙酰胆碱受体的制备及结合试验

(一) 人骨骼肌烟碱型乙酰胆碱受体的制备

取截肢人骨骼肌200g, 切成小块, 弃筋膜及脂肪, 立即投入4倍体积预冷的I号磷酸缓冲液(含PBS0.05M, pH7.5, NaCl 0.1M, EDTA0.001M, 抑肽酶 2×10^4 u/L, 叠氮化钠0.02%)。用组织粉碎机制成匀浆, 初慢速搅切5秒钟, 后高速15秒钟, 三次共一分钟, 用纱布滤去组织碎块。采用差速离心提纯受体, 低速离心, 3500rpm, 30分钟, 取上清液, 弃沉淀物; 高速离心, 20,000g, 20分钟, 弃上清液, 留沉淀物, 加3倍体积II号磷酸缓冲液(I号磷酸缓冲液中含1% Triton X-100), 搅拌90分钟; 超速离心100,000g, 60分钟, 除去表面脂肪, 吸取上清液。用III号磷酸缓冲液(I号磷酸缓冲液中含0.1% Triton X-100)透析16小时。样品置 -20°C 贮存备用。按Lowry氏法(Lowry, 1951)测定蛋白量, 以牛血清白蛋白作标准, 上清液中蛋白质含量要求大于1mg/ml, 实际达3.6mg/ml。

(二) 烟碱型乙酰胆碱受体结合试验

1. 方法: 一般需用超量碘标眼镜蛇神经毒素与受体结合。为摸索投量比例, 我们试取自肌肉提纯的乙酰胆碱受体上清液0.5ml(相当4g肌肉湿重), 分别加4种不同量的 ^{125}I 眼镜蛇神经毒素, 8.5 μl (1.87PM)、17 μl (3.74PM)、34 μl (7.48PM)、68 μl (14.96PM), 37°C 保温2小时, 后将样品经Sephadex G-200凝胶柱过滤。

2. 鉴定

①Sephadex G-200柱层析 柱床体积 $0.9 \times 12\text{cm}$, 先用0.1%牛血清白蛋白饱和层析柱, 用0.5% Triton X-100的I号磷酸缓冲液平衡, 将上述保温结合的4个样品分别装入层析柱, 用同样的缓冲液洗脱, 速度4~5 ml/小时, 每管收集0.5ml, 置井型闪烁器计数。结果见图6。

各柱 ^{125}I -NT-AChR复合物的放射量(μCi)

$$= \frac{{}^{125}\text{I}-\text{NT-AChR复合物 cpm}}{2.2 \times 10^8 \text{ cpm}}$$

^{125}I -NT-AChR结合率

$$= \frac{{}^{125}\text{I}-\text{NT-AChR复合物cpm}}{{}^{125}\text{I}-\text{NT-AChR复合物cpm} + {}^{125}\text{I}-\text{NTcpm}} \times 100$$

每克肌肉湿重中眼镜蛇神经毒素结合点的回收率(pM/g)

$$= \frac{\text{每克肌肉湿重中}{}^{125}\text{I}-\text{NT-AChR复合物cpm}}{{}^{125}\text{I}-\text{NT cpm/pM}}$$

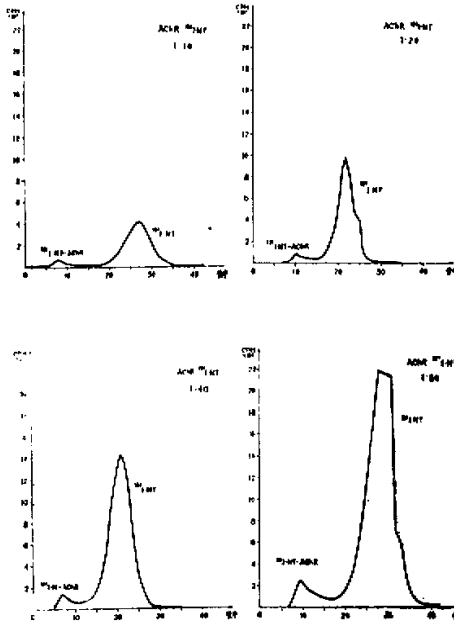


图6 不同倍数碘标眼镜蛇神经毒素与乙酰胆碱受体结合的层析图

乙酰胆碱受体与不同比例的¹²⁵I眼镜蛇神经毒素结合试验的结果计算如下表：

乙酰胆碱受体与不同比例的¹²⁵I眼镜蛇神经毒素结合试验比较表

	AChR~ ¹²⁵ I-NT			
	I柱	II柱	III柱	IV柱
AChR- ¹²⁵ I-NT复合物的放射量(μCi)	0.010	0.020	0.023	0.050
AChR- ¹²⁵ I-NT结合率(%)	10.1	7.5	6.1	6.8
每克肌肉湿重中神经毒素结合点的回收率(pM/g)	0.120	0.122	0.186	0.400

总的看来，加大碘标眼镜蛇神经毒素量可以提高¹²⁵I-NT-AChR复合物的放射量和每克肌肉湿重中眼镜蛇神经毒素结合点的回收率。

②竞争抑制试验及非特异性结合试验 取碘标眼镜蛇神经毒素(1.87pM)及5000倍的未标记眼镜蛇神经毒素(220nM)，同样加肌肉提纯受体上清液，保温，过柱，结果

表明有明显竞争性抑制(见图7)

取碘标眼镜蛇神经毒素(1.87pM),加牛血清白蛋白(14nM),同样保温和过柱,未见碘标眼镜蛇神经毒素与牛血清白蛋白有非特异性结合(见图8)

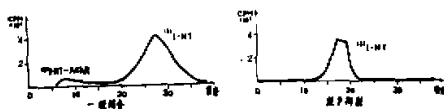


图7 碘标与未标记眼镜蛇神经毒素竞争抑制试验

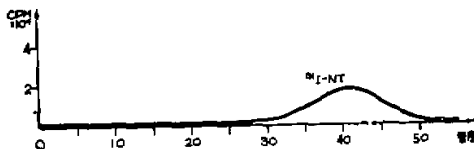


图8 碘标眼镜蛇神经毒素与牛血清白蛋白非特异性结合试验

③菸硷型乙酰胆硷受体抗体的测定 取 ^{131}I 眼镜蛇神经毒素—乙酰胆硷受体复合物(0.12pM),加重症肌无力患者血清 $5\mu\text{l}$,于 4°C 保温16小时充分结合,加羊抗人IgG $100\mu\text{l}$, 37°C 保温3小时。高速离心 $8,000\text{g}$,5分钟,用含0.5%TritonX-100的I号磷酸缓冲液1ml清洗一次,再离心一次。取二次上清液及沉淀物烟焯计数。按工作单位计算受体抗体,正常值 <0.2 工作单位/L(Lefvert,1978)。5例全身型重症肌无力患者,其中4例测得乙酰胆硷受体抗体(0.27~4工作单位/升血清),结果将于另文发表。

讨 论

一、眼镜蛇分布于我国华南及华中地区,含毒汁较多,主要为神经毒素。大部为61~62个氨基酸残基短链毒素,系硷性多肽,等电点9.2,分子量为7,000左右(陈运聪,1978)。本组实验采用昆明动物研究所经CM-纤维素柱层析分离提纯的E峰神经毒素,证明有突触后膜的去极化作用(龚潮梁,1978)。我们用氯胺T氧化法进行眼镜蛇神经毒素碘标记,取得较高标记率(80%),比放射性为 $6\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$,碘标后仍保持其抗原性,与乙酰胆硷受体具有特异性的亲和力,可用于制备 ^{131}I -NT-AChR复合物,于临床检测重症肌无力患者乙酰胆硷受体抗体。用放射免疫分析法达微微克分子水平,具有微量和专一分析的特征。说明碘标记眼镜蛇神经毒素确实是一种有用的生物分子探测剂。

用氯胺T碘标眼镜蛇神经毒素,方法简便易行。为取得较高比活性,除要求蛇毒必须有足够的纯度和活性外,还要掌握神经毒素与氯胺T的比例及作用时间,否则将损害

神经毒素的活力。 ^{131}I 半衰期短，为便于较长时间的实验，可改用 ^{125}I 按同样方法进行标记。

二、菸硷型乙酰胆碱受体，为生物膜酸性球蛋白，等电点5.2（与 α -神经毒素结合的复合物）或4.8（游离的受体），单体分子量一般为40,000(Lindstrom, 1977)。人类骨骼肌该受体的浓度约为 1.1×10^{-12} 克分子/每克肌肉湿重(Heidmann, 1978)，其浓度比肝脏胰岛素受体(1mg/g肝湿重= 1.33×10^{-8} 克分子/每克肝湿重)(北京动物所, 1975)少得多，分离提纯难度较大。要求取材必须新鲜，整个提纯过程在4℃条件下进行，争取24~48小时内能取得提纯上清液。本组采用人类截肢骨骼肌，于阻断血循后立即取样，投入预冷保养液，将肌肉切成小块，剪除脂肪及筋膜。保养液除含磷酸缓冲液外加抑砒酶(为上海生物化学制药厂产品)，有广泛的蛋白酶抑制作用；EDTA为低离子强度的络合剂，能改变肌膜静电条件(Maddy, 1976)；Triton X—100为非离子去垢剂，二者均可使乙酰胆碱受体从肌膜解聚而出。整个分离提纯过程溶剂中需有去垢剂以保持受体蛋白的水溶性，否则受体发生沉淀。然而去垢剂也可能改变膜蛋白的构象(北京动物所, 1975)，故必须控制Triton X—100浓度。最后将提纯受体上清液进行透析。

本组实验结果表明，用超量碘标眼镜蛇神经毒素可以提高每克肌肉湿重中眼镜蛇神经毒素结合点的回收率(即比活性)，乙酰胆碱受体与 ^{131}I 眼镜蛇神经毒素一般按1:10或1:20比例即可制成复合物，用于检测重症肌无力患者乙酰胆碱受体抗体(Lefvert 1978)。

小 结

本文报告用氯胺T氧化法碘标眼镜蛇神经毒素，可取得较高结合率(80%)，比活性 $6\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 。经火箭电泳等法鉴定证明碘标后眼镜蛇神经毒素仍保持抗原性。取人截肢骨骼肌，用差速离心及去垢剂提纯菸硷型乙酰胆碱受体，与不同量碘标眼镜蛇神经毒素结合可以制备成 ^{131}I 眼镜蛇神经毒素—乙酰胆碱受体复合物，其比活性为0.12~0.40 pM/g，已查得重症肌无力患者的乙酰受体抗体。用碘标眼镜蛇神经毒素检测菸硷型乙酰胆碱受体及其抗体，具有微量分析(达微微克分子水平)和专一性分析的特征，说明重症肌无力是一种自身免疫疾病。于临床检测菸硷型乙酰胆碱受体抗体，将有助于诊断，为探讨疗效提供客观指标。

参 考 文 献

- 中国科学院北京动物研究所内分泌室胰岛素组 1975胰岛素作用原理的研究。生物化学与生物物理学报 7:71
- 陈远聪 1978 蛇毒神经毒素的结构与功能。蛇毒的研究与利用讨论会资料。
- 莫潮梁等 1978 眼镜蛇神经毒素的分离及其针剂——克痛灵的制备。蛇毒的研究与利用讨论会资料。
- 杨钦照 1977 蛇毒的神经毒素，蛇伤防治(江苏蛇伤防治科研协作组编) 11:39

- Heidmann, T. et al. 1978 Structural and functional properties of the acetylcholine receptor protein in its purified and membrane-bound states. *Ann. Rev. Biochem.* 47:317
- Lefvert, A. K. et al. 1978 Determination of acetylcholine receptor antibody in *Myasthenia gravis*. Clinical usefulness and pathogenetic implications. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatol.* 41: 394
- Lindstrom, J. M. et al. 1976 Experimental autoimmune Myasthenia gravis and Myasthenia gravis. Biochemical and immunochemical aspects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 274: 254
- Lindstrom, J. M. et al. 1977 An assay for antibodies to human acetylcholine receptor in serum from patients with Myasthenia gravis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 7:36
- Lowry, O. H. et al. 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265
- Maddy A. H., 1976 Biochemical analysis of membranes P 188 Chapman and Hall Ltd.

PRIMARY USE OF IODINE LABELED NEURO-TOXIN-ACETYLCHOLINE RECEPTOR COMPLEX IN MYASTHENIA GRAVIS RESEARCH

TUR LAIR—HUI

CHANG REN—CHIN

QIAO ZHI—MINE

YANG JIAN

THE FIRST HOSPITAL OF THE SECOND ARMY MEDICAL COLLEGE, SHANGHAI

ABSTRACT

By means of chloramine T oxidation method, α neurotoxin from *Naja naja* was labeled with ^{131}I . After passing over a sephadex G 25 column and applied ascending paper chromatograph, the rate of label reached to higher degree (80%). The specific activity was $6\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. With the help of two dimensional double immunodiffusion and rocket immunoelectrophoresis self-illumination, its antigenicity still maintained was proved.

Using the nonionic detergent and rate-zonal centrifuge, nicotinic acetylcholine receptor were purified from human skeletal muscle of the amputated extremity. The protein content of supernatant was $3.6\text{mg}/\text{ml}$. This supernatant was incubated with

various multiplied over-dose iodine labeled α neurotoxin to prepare 125 I labeled toxin-AChR complex. Passing over a sephadex G-200 column, its specific activity amounted to 110~378.5 pM/g. The iodine labeled neurotoxin and 5000 times unlabeled neurotoxin were incubated with AChR preparation resulting obvious competitive inhibition. Besides, there wasn't any nonspecific binding between iodine labeled neurotoxin and bovine serum albumine. According to the method used in the anti-human globulin test, the 125 I labeled neurotoxin-AChR complex was incubated with the serum of myasthenia gravis. Then goat-anti-human globulin was added for immunoprecipitation. The antibodies binding to acetylcholine receptor (0.264 arbitrary units/l) were detected in the four of the five patients with generalized type of myasthenia gravis.

This experiment demonstrated that iodine labeled neurotoxin used as to detect nicotinic acetylcholine receptor and its antibody was characterized by its analysis up to 10^{-12} mole and definite specificity. It also proved that myasthenia gravis is as autoimmune disease. To detect nicotinic acetylcholine receptor antibody may become as an useful means in the diagnosis and also contributes to the investigation of therapy as an objective index.