

# 人工抗原诱发的毒蕈碱样胆碱受体亚型特异抗体<sup>①</sup>

赵树进<sup>1②</sup> 孙桂玲<sup>2</sup> 胡本荣<sup>1</sup>

(1 中山医科大学药理教研室,广州,510089 2 广州医药卫生研究所)

**提 要** 人工合成  $m_1$  和  $m_2$  胆碱受体蛋白在细胞外侧的一段多肽,联接蛋白 KLH 后免疫家兔,制备出抗血清,经 ELISA 法,免疫组化测定,该抗血清具有效价高和特异性强的特点。人工抗原制备高效价特异性  $m$  受体亚型抗体对进一步了解药物与  $m$  受体相互作用的分子机制以及建立新型  $M$  受体的检测方法均有重要意义。

**主题词** 多肽;受体,胆碱能;抗体

**中图分类号** R 971.9

毒蕈碱样胆碱受体( $M$ 受体)介导许多乙酰胆碱对神经元或其它可兴奋细胞的激动作用<sup>[1]</sup>。以往药理学家根据对 pirenzepine 亲和力的高低将  $M$ 受体分为  $M_1$  和  $M_2$  两种亚型<sup>[2]</sup>,随后,分子生物学的研究结果表明至少存在 5 种  $m$ 受体亚型<sup>[3,4]</sup>。由于目前尚不能用经典药理学的方法或者放射配基结合分析法检定出 5 种  $M$ 受体,因此,一般将药理学方法检定毒蕈碱受体定义为  $M$ 受体,而将分子生物学描述的毒蕈碱受体定义为  $m$ 受体<sup>[5]</sup>。本文根据  $m$ 受体多肽部分节段的氨基酸序列合成人工多肽抗原,制备特异性  $m_1$  和  $m_2$ 受体抗体,为进一步研究  $M$ 受体的分子作用机制,将免疫学方法引入受体研究中建立  $m$ 受体检测方法奠定了基础。

## 1 方法与结果

### 1.1 多肽链的选择及合成

$m$ 受体共有 7 个跨膜区,分为膜外多肽链和膜内多肽链<sup>[6]</sup>,因为本研究的目的之一是建立  $M$ 受体的免疫学检测方法,所以选择  $m$ 受体多肽链的细胞外  $N$ 端部分节段的氨基酸序列作为人工抗原多肽组成,其中  $m_1$

受体的氨基酸序列为 MNTSAPPAVSP-NITVLAPGKGPW,  $m_2$ 受体的氨基酸序列为 MNNSTNSSNNSLALTSPYKTF。根据这两种氨基酸序列用多肽合成仪(multiple peptide system, La Jolla, CA)合成多肽,并通过反相 HPLC 纯化。

### 1.2 抗原抗体的制备

按照 Green 等人的方法<sup>[7]</sup>,两种多肽分别与钥孔蠍血蓝蛋白(KLH)联接。-20℃保存。肽-KLH 复合物用磷酸缓冲液(PBS pH 7.4)配成 10mg/ml 溶液作为抗原,免疫新西兰大耳兔(体重 2.5-3.0Kg)。免疫方法:肽-KLH 复合物加福氏完全佐剂(1:1),皮下及皮内多点注射,每只 2mg,以后每隔 3 周用肽-KLH 复合物加福氏不完全佐剂(1:1),皮下及皮内多点注射,每只 2mg,以加强免疫。免疫 3 次后耳缘静脉取血测定抗血清效价。共注射 5 次。最后一次免疫加用静脉注射肽-KLH 溶液,1mg/只。最后一次注射后一周,家兔颈动脉放血,常规方法分离血清。

### 1.3 抗血清的鉴定

1.3.1 肽作为免疫吸附剂对兔抗血清的 ELISA 测定 将合成多肽作为抗原包被到

① 国家自然科学基金资助课题;

② 第一作者,男,1958 年出生,博士后,现在广州军区总医院

96孔ELISA反应板中(1.0 $\mu$ g/孔0.15%戊二醛),4 $^{\circ}$ C过夜,充分淋洗后用2%牛血清白蛋白封闭,37 $^{\circ}$ C温育2h,洗涤3次,加入不同浓度的抗血清或正常兔血清,37 $^{\circ}$ C温育2h,充分洗涤3次,加入1:200辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG,37 $^{\circ}$ C温育2h,洗涤3次,加入邻苯二胺底物液。在37 $^{\circ}$ C,20min加入2nmol/L硫酸溶液终止反应,在酶标仪上490nm处读取OD值。结果见图1。

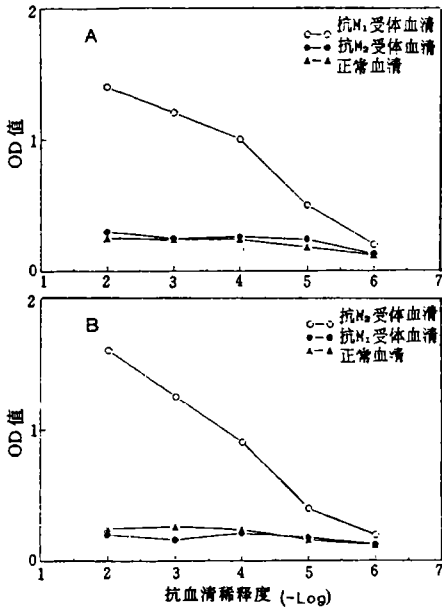


图1 合成多肽作为抗原的ELISA法鉴定兔抗血清  
A: m<sub>1</sub>人工合成m<sub>1</sub>受体; B: m<sub>2</sub>人工合成m<sub>2</sub>受体

图1结果表明本文所制备的抗血清对人工合成的m<sub>1</sub>和m<sub>2</sub>受体细胞外氨基末端多肽有高度的特异性,效价满意。

1.3.2 大鼠大脑组织膜制备作为免疫吸附剂对兔IgG的ELISA测定 成年SD大鼠,断头处死,迅速取出大脑,加入适量PBS(pH 7.6,含0.25mol/L蔗糖)内切式匀浆器匀浆1min后,用Teflon匀浆器匀浆,离心2000 $\times$ g 10min,将上清液转入另一试管中,离心27500 $\times$ g 15min。沉淀用适量包埋液混匀,包埋至96孔ELISA反应板中,4 $^{\circ}$ C,过夜。封闭,加入不同稀释度的兔抗M<sub>1</sub>和M<sub>2</sub>受体

IgG或正常兔血清,37 $^{\circ}$ C,2h,洗涤后加入酶标羊抗兔IgG,37 $^{\circ}$ C,20min,底物反应和测定OD值等同前,结果见图2。

图2结果提示用ELISA法以大鼠大脑组织膜为吸附剂,本文所制备的抗体能与大鼠大脑组织发生特异性结合。

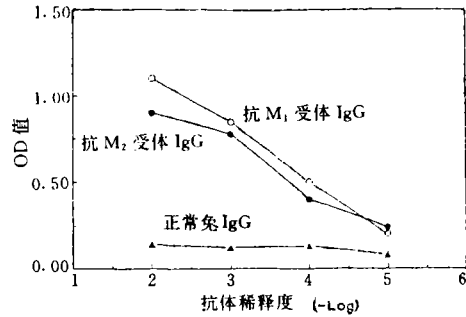


图2 大鼠脑组织作为抗原的ELISA法鉴定兔IgG

1.3.3 免疫组织化学法对特异性m受体抗体的鉴定 大鼠断头,取完整大脑,放入液氮中冷冻2h后,在冷冻切片机上冠状切片。切片条件:箱温-40 $^{\circ}$ C。刀温-20 $^{\circ}$ C。切片厚度10 $\mu$ m,贴在载玻片上。将1:100抗M<sub>1</sub>和M<sub>2</sub>受体抗血清或正常兔血清(含2%牛血清白蛋白)分别均匀滴加在脑切片表面,于湿盒中4 $^{\circ}$ C反应过夜。次日用PBS(pH 7.6)洗涤3次。在切片表面均匀滴加荧光标记羊抗兔IgG(1:40),于暗盒中37 $^{\circ}$ C 60min,PBS洗涤3次。于荧光显微镜下观察荧光并拍照。结果见图3。

观察同一切面的荧光,发现M<sub>1</sub>和M<sub>2</sub>受体抗血清处理切片显示荧光,而正常兔血清处理切片不显示荧光;提示M<sub>1</sub>和M<sub>2</sub>受体抗血清均能与大鼠脑切片发生特异性结合。

## 2 讨论

本文根据M受体在细胞外侧N端多肽部分节段的氨基酸序列人工合成多肽作为抗原制备出M受体抗体。经多肽抗原ELISA检测,证实所制备抗血清对M<sub>1</sub>和M<sub>2</sub>受体的

合成多肽具有良好的选择性,经大鼠脑组织细胞膜标本作为抗原的 ELISA 检测和大鼠大脑免疫组化检测,结果表明两种抗体均可与大鼠脑发生特异性结合,说明该抗体与 M 受体具有良好的抗原抗体反应。以往对 M 受体的检测多采用放射配基结合分析法或放射自显影法,这些方法不仅有放射性同位素污染,且由于核素标记配基对 M 受体亚型间的选择比较差,影响了这些方法在特异性检测 M 受体亚型中的使用。本文所制备的特异性 M 受体亚型抗体为采用免疫学方法检测 M 受体及其亚型奠定了物质基础。

(本文图 3 见封 3)

(上海市肿瘤研究所马安卿教授在多肽合成中给予支持和帮助,上海市医学检验重点实验室罗伟博士在抗体检测中给予指导,在此一并致以谢意)

### 参 考 文 献

- 1 Nathanson NM. Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. *Annu. Rev.*

*Neurosci*,1987,10 : 195

- 2 Hammer R, Birdsall T. Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature (Lond)*, 1980, 283 : 90
- 3 Bonner TI. New subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *TiPS*, 1989, suppl : 11
- 4 Kubo T, Fukuda K, Maeda A, et al. Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature (Lond)*, 1989, 323 : 411
- 5 Mei L, Roeske WR, Yamamura HI. Molecular pharmacology of muscarinic receptor heterogeneity. *Life Sci*, 1989, 45 : 1831
- 6 Bonner TI. The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends Neurosci*, 1989, 12 : 148
- 7 Green NH, Alexander A, Olson S, et al. Immunogenic structure of the influenza virus hemagglutinin. *Cell*, 1982, 28 : 477

(1994-09-21 收稿 1995-06-20 修回)

## SUBTYPE-SPECIFIC ANTIBODIES FOR MUSCARINIC CHOLINERGIC RECEPTORS INDUCED WITH SYNTHESIZED PEPTIDES ANTIGENS

Zhao Shujin Sun Guiling Hu Bengrong

(Department of Pharmacology of Sun Yat-Sen University of Medical Science, Guangzhou 510089)

The subtype-specific antibodies against the synthetic peptides corresponding to sequence of the N-end polypeptides of M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> subtypes of mAChR have been prepared. Two different antibodies were tested their reactivity and specificity for different synthesized peptides and brain tissues by ELISA and immunological fluorescent assay. These results suggested that the antibodies were characterized by high-specificity and high-reactivity to mAChR subtypes and should be valuable tools for further study of the properties and binding sites of subtypes of mAChR.

**Subject headings** synthesized peptides; receptor/muscarinic acetylcholine; antibody