DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).1995.0108

苯二氮卓受体的提纯及受体亚基单克隆抗体的制备[①]

邱鹏新[1,②] 颜光美[1] 胡本荣[1] 苏兴文[1] 刘乐和[2]

(中山医科大学 1 药理教研室;广州,510089,2 免疫学教研室)

提　要　用本实验室建立的亲和层析系统成功地从猪脑分离纯化了苯二氮卓受体(BZ-R)。结合试验显示,纯化的 BZ-R 和专一配基最大的结合容量为 1970 fmol/mg 蛋白,解离常数 Kd 值为 5.71nmol/L,圆盘电泳和等电聚焦电泳均显示出单一区带。纯化受体经 SDS-聚丙烯酰胺不连续电泳,可分离出分子量分别为 59ku、56ku、51ku、48ku 和 38ku 的 5 条区带。用这些区带蛋白免疫动物,得到了 3 种单克隆抗体,酶联免疫检测显示,它们和纯化受体结合的最大滴度分别为 1∶30 000,1∶22 000,1∶22 000。免疫印迹显示,3 种单克隆抗体分别和 59ku、56ku、51ku 的亚基结合,显示出单一清晰的反应带。以上结果说明,我室建立的 BZ-R 亲和层析系统是一个稳定、重复性好的受体纯化系统。纯化的 BZ-R 对专一配基有很高的亲和力并达到较高的纯度。纯化的 BZ-R最少由 4 个亚基组成。制备的 3 种单克隆抗体有一定效价及很高的特异性。

主题词　苯二氮卓类;受体,药物/分离和提纯;抗体,单克隆

中图号　R338;R392.11

苯二氮卓类(benzodiazepines BZs)药物 60 年代已应用于临床[1],至今仍然广泛使用。由于 BZs 及其同系物与受体的特异性作用不尽一致,其作用机制至今仍未完全阐明。已发现 BZ-R 在不同脑区的分布和生理功能略有不同[2],据认为 BZ-R 至少由 4 种亚基蛋白组成,其分子量分别为 51、53、55、59ku,近年来发现 α、β、γ 亚基表现有多种同型物(isoform),如 α1、α2、α3 等,α1 主要出现在小脑的 BZ-R,α2、α3 主要在大脑皮质,海马区的 BZ-R 受体,它们的生理功能比以往所了解的要复杂得多,有必要进一步探索。我国目前对上述的研究很少。我校受体实验室继续使用颜光美在 1988 年合成的 BZ-R 亲和配体,以及解亲和剂,成功的分离纯化得 BZ-R 蛋白的基础上,进一步分离受体亚基,制备它们的单克隆抗体,以便在受体水平上揭示 BZ 类药物的作用机制。

1　材料与方法

1.1　BZ-受体蛋白的分离纯化及鉴定

1.1.1　受体分离纯化　家猪经颈动脉放血处死后,立即取出全脑,在 4℃除去软脑膜及血管,取前叶皮质,用电动匀浆制成悬液。悬液经 1 000g×10min 离心,上清液再以 57 000g×20min 离心收集沉淀,加入等容积含 0.05%TRiton X-100 的 Tris-HCl 缓冲液,玻璃匀浆器手动匀浆 1min,再次以 100 000g×60min 超速离心,将上清液加入经偶联平衡好的亲和层析柱[3]。上柱完毕,用不同盐浓度的缓冲液洗涤 3 次,直至洗涤液的蛋白含量为零时,取出亲和胶,加入含有 1g 解亲和剂(Copm Ⅰ)的 30ml Tris-HCl(pH 7.4),在 4℃悬空搅拌 4h,以负压抽滤收集样品,用空心纤维装置(Hollow Fiber System Cole-Parmer USA)进行搅拌透析,每 4h 更换 1 次透析液,换 3 次后,用 1mol/L HCl 检查透析液,若无颜色反应,则表明样品中 Copm Ⅰ 已部透出。将样品适当浓缩,即为纯化的 BZ-R 蛋白。

1.1.2　纯化的 BZ-R 的结合试验及生化鉴定　①结合试验:5ml 聚丙烯试管加入受体蛋白 100μg,加^{3}H-FNP 的量从 0.78~50μl(73Ci/nmol),非特异管加入 50μl 安定(1.37μmol/L)总反应体积 500μl,37℃孵育 30min 后,移入 4℃继续反应 30min,加入预冷的(4℃)人血清丙种球蛋白 200μl(10mg/ml),摇匀后迅速加入 500μl 20% PEG 6 000 摇匀后立即用 GF/B 滤纸负压抽滤,洗涤 3 次,用

① 国家自然科学基金资助课题;

② 第一作者,1961 年出生,男,主管技师

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

GF/B 滤纸在 70℃烘烤 60min,用 LKB 双道自动液闪仪计数 CPM 值。数据处理采用质量作用模型由计算机进行稳健回归处理(软件由上海第二医科大学实验核医学教研室提供)。②圆盘电泳:参考张承圭的方法进行[4],浓缩胶为 3%(pH6.7),分离胶浓度为 9%(pH 8.9)。③等电聚焦电泳:参考何忠效等方法进行[5]凝胶浓度为 6%,含 2% Ampholine,每管加样 8μl 含 3μg 蛋白。

1.2 受体亚基的制备

将上述纯化的受体蛋白加温和变性剂 SDS 和 β-巯基乙醇,100℃煮 2min,分离胶浓度为 10%,浓缩胶浓度为 5%,电泳完毕,将胶切成两半,一半固定染色作参考,将未染色的一半胶分别切取分子量为 59ku、56ku、51ku、48ku、38ku 亚基蛋白区带,磨成碎状,以备免疫之用。

1.3 受体亚基单克隆抗体制备

1.3.1 免 疫 将上述磨碎的 BZ-R 亚基蛋白胶,和等量的福氏完全佐剂混合乳化后,给 7 周龄的 BALB/c 小鼠皮下注射,每点 0.2ml,基础免疫两次,间 3 周,融合前 3d 以 0.2ml 纯化受体蛋白(400μg/ml)作静脉注射。

1.3.2 细胞融合及克隆 按 Kohler[6]等建立的方法,取脾制备细胞悬液与鼠 SP2/0 骨髓瘤细胞以 1:10 比例,在 50%PEG(MW3 700)作用下融合,融合后加含 20%牛血清的 HAT 培养液将其制成细胞悬液,转入含小鼠腹腔巨噬细胞(10^5/孔)的 96 孔的细胞培养板内,置 37℃ 7% CO_2 恒温的温箱中培养,d4 换 HAT 培养液,d10 改用含 HT 培养液,2 周后改用 RPMI 1640 完全培养液,待细胞克隆长至占孔面积的 1/3~1/2 时,取上清液检测抗体。

1.3.3 单克隆抗体的筛选及效价测定 采用酶联免疫分析法对单克隆抗体进行筛选,具体程序是:用 0.05mol/L 碳酸氢钠缓冲液稀释纯化的受体蛋白,包被 40 孔聚苯乙烯塑料板,每孔 0.1ml(含受体蛋白 0.1μg),4℃过夜,洗涤后用 10%牛血清封闭,加入不同培养上清 0.1ml 于 37℃孵育 2h,辣根酶标记兔抗小鼠 IgG 反应 1h,TMB 底物溶液,显蓝色者为阳性。选阳性孔进行多次克隆,然后用同样的方法以 OD 值检测每种单克隆抗体的最大滴度。

1.3.4 免疫印迹试验 在 SDS 凝胶电泳中,分别加入标准蛋白、纯化受体蛋白及溶性膜蛋白,经电泳后再将蛋白转移到硝酸纤维膜上。将有标准蛋白、纯化受体及小部分溶性膜蛋白的硝酸纤维膜切出,用氨基黑 10B 染色作参考,其余含溶性膜蛋白的硝酸纤维膜切成小条,加不同单抗孵育,按免疫组织化学 PAP 法,进行免疫染色,拍照分析各种单抗所结合的受体亚基蛋白的分子量。

2 结 果

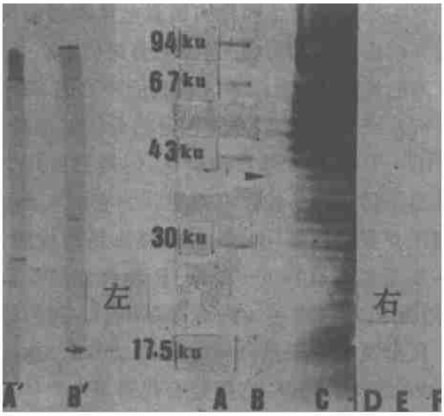
2.1 纯化的 BZ-R 蛋白的结合试验及生化鉴定

2.1.1 结合试验 用放射受体方法,对纯化的 BZ-R 进行结合试验,纯化的 BZ-R 和专一配基氟硝安定(FNP)的最大结合容量(Rt)值为 1970 fmol/mg 蛋白,解离常数 Kd 值为 5.71nmol/L, Hill 系数为 1.112。

2.1.2 圆盘电泳和等电聚集电泳 纯化的 BZ-R 蛋白经圆盘电泳和等电聚焦电泳其结果均显示为单一的区带(附图左)。

2.2 BZ-R 亚基制备

经 SDS-聚丙烯酰胺不连续电泳显示,纯化的 BZ-R 可分为 5 条蛋白区带,分子量分别为 59ku、56ku、51ku、48ku 和 38ku,前四条区带很明显,最后一条 38ku 较弱,只隐约可见(附图右)。



附图 电泳与免疫印迹

1)左:圆盘电泳及等电聚集电泳: A' 圆盘电泳,B' 等电聚集电泳。2)右:SDS 电泳及免疫印迹:A 标准蛋白;B 纯化受体 5 亚基带、箭头示 38ku;C 溶性膜蛋白;D ABR 1 反应带;E ABR2 反应带;F ABR3 反应带

2.3 BZ-R 亚基的单克隆抗体的效价及性质

2.3.1 抗体效价 5 种亚基蛋白免疫动物,经细胞融合后,筛选到 3 株能分别产生抗单一受体亚基(ABR)的杂交瘤,命名为 ABR1、ABR2、ABR3。用酶联免疫检测的结果显示 3 株杂交瘤的培养上清及其

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

注入同系小鼠腹腔后所得腹水和纯化受体结合的最大滴度分别为：ABR1 上清为 1：800，腹水为 1：3 000，ABR2 上清为 1：600，腹水为 1：22 000，ABR3 上清为 1：600，腹水为 1：22 000。

2.3.2　免疫印迹　结果见图 4，ABR1、ABR2 和 ABR3 分别只和溶性膜蛋白的单一区带结合，分别只显示出一条清楚的阳性反应带。3 条带的分子量分别为 59ku、56ku、51ku。

2.3.3　染色体分析　小鼠脾细胞染色体平均为 40 条，SP2/10 骨髓瘤细胞的染色体平均为 70 条。杂交瘤染色体平均为 95～103 条，具有两个亲本细胞的特性。

3　讨　　论

本研究用颜光美等[3]建立的 BZ－R 亲和层析系统，成功地从猪脑中分离纯化出 BZ－R。经放射受体方法检测结果显示，其和中枢型专一配基最大的结合容量 1970fmol/mg 蛋白，解离常数 Kd 为 5.71nmol/L，Hill 作图的结果显示，Hill 系数为 1.112，相关系数为 0.96，说明纯化的 BZ－R 的较高的化学选择性和可饱和性。圆盘电泳和等电聚焦电泳均显示出单一的蛋白带，说明分离的 BZ－R 已达到较高的纯度。以上结果表明我们建立的 BZ－R 亲和层析系统是一稳定、重复性好的受体纯化系统。

BZ－R 存在亚基已被公认，但是它由几个亚基组成迄今仍存在争论。有报道认为它由 α、β 亚基外可能还存在 γ 亚基[7]。有人则提出新的设想，认为 BZ－R 可能具有和 n－Ach－R 相类似的 5 聚体结构，即由 α、2β、γ、δ 等 4 种亚基组成[8]。我们纯化的 BZ－R 分离出分子量分别为 59ku、56ku、51ku、48ku 及 38ku 的 5 条区带。它们是否代表多个聚体 5 种不同的亚基，迄今还不能下结论。有人从鸡胚脑分离出 BZ－R，并证明它含有 3 种亚基蛋白，分子量分别是 48ku、50ku、51ku[9]，其中 48ku 亚基和我们分离的 48ku 区带相一致，所以我们认为 48ku 也是 BZ－R 的一种亚基。BZ－R 是否存在 38ku 的亚基迄今未见类似的报道，这个问题有待探讨。

抗 BZ－R 亚基的单克隆抗体制备的报道很少，我们成功地制备了分别抗 59ku、56ku 和 51ku 单一亚基的单克隆抗体，经酶联免疫检测，它们和纯化受体结合的最大滴度分别为 1：30 000，1：22 000，1：22 000。免疫印迹的结果显示，每一单抗只能和单一的亚基结合，显示出一条清楚的带，分子量分别为 59ku、56ku、51ku，说明 3 种单抗有一定使用效价并有较高的特异性。

参　考　文　献

1　Tallman JF. Paul SM, Skolnick. et al. Receptor for age of anxiety: pharmacology of the benzodiazepines. Science, 1980, 207：274

2　Dobel A, Martin LL. Mutiple benzodiazepine receptor: no reason for anxiety. Trends Pharmacol Sci, 1992, 13：76

3　颜光美. 中型苯二氮卓受体研究. 生理科学进展，1990，21：256

4　张承圭，吕慧梅. 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 见：何忠效，张树政主编. 电泳. 北京：科学出版社，1990. 12～74

5　何忠效，郭尧君. 等电聚焦. 见：何忠效，张树政主编. 电泳. 北京：科学出版社，1990. 75～142

6　Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fussed cells secreting antibody of prolefined specificity. Nature, 1975, 257：495

7　Pritchett DB, Southeimen H, Shivers BD. Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. Nature, 1989, 338：582

8　Sieghar W. Multiplicity of GABAA－benzodiazepine receptors. Trends Pharmacol Sci 1989, 10：407

9　Yin HS, Fan SS. Monoclonal antibodies recognizing the benzodiazepine receptor of chick embryo brain. J Recept Res, 1990, 10：249

(1995-04-17 收稿　1995-09-06 修回)

(下转第 47 页)

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.ne

PERIODONTAL EPIDEMIOLOGICAL SURVEY OF ADOLESCENCES AND CHILDREN WITH BLINDNESS OR MENTAL RETARDATION IN GUANGZHOU

Li Ronglin Li Chunyang

(Faculty of Stomatology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

The Dental prevention and treatment management for adolescences and children with blindness or mental retardation have not been regular in Guangzhou. The first periodontal epidemiological survey in the several regions of Guangzhou areas, has been carried out. 430 cases (male 264, female 166) were investigated with the standard methods published by WHO. The results showed that gingivitis was found in 70.46%, early periodontal diseases in 3.95%, and serious periodontal diseases in 1.16%. It is concluded that most of them (83.25%, 358 cases) should have OHI and periodontal treatment, 5 cases (1.16%) must have comprehensive periodontal cure.

Subject headings periodontal diseases/epidemiology; blindness; mental retardation; adolescence; child

(上接第 44 页)

PURIFICATION OF BENZODIAZEPIN RECEPTOR AND THE PREPARATION OF ITS SUBUNIT MONOCLONAL ANTIBODIES

Qiu Pengxin Yan Guangmei Hu Benrong Su Xingwen Liu Lehe

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

Benzodiazepine receptor was purified from porcine brain by chromatography method as previously described. Radio-ligand binding analysis of the purified receptor indicated that its B_{max} and Kd were 1 970 fmol/mg protein and 5.71nmol/L respectively. A single band was shown in disc gel electrophoresis and isoelectrofocusing of the receptor protein. By means of SDS acrylamide gel electrophoresis the receptor protein was separated into 5 zone bands with corresponding molecular weights of 59ku, 56ku, 51ku, 48ku, 38ku subunits. Immunizing mice with these subunit proteins, three monoclonal antibodies were obtained. They could specifically bind to the corresponding subunits and exhibit clear bands by immunoblotting. These results suggested that BZ—receptor chromatographic system used in this study was a stable and reliable procedure for purifing the BZ—receptor.

Subject headings benzodiazepins; receptors, drug/isolation and purification; antibodies, monoclonal

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net