

利用 ^3H -哇巴因测定人红细胞钠泵数量的方法

徐 光 李茂深 沈慧芬 顾天爵

(上海第一医学院生化教研室)

红细胞钠泵对于维持红细胞形态及功能具有重要的意义。用 ^{86}Rb 测定钠泵活性,受细胞内代谢物及各底物浓度的影响,用 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活性表示钠泵活性也受 $[\text{Na}^+]$ 、 $[\text{K}^+]$ 、 $[\text{ATP}]$ 等的影响^[1,2]。因此上述方法难以作为膜上钠泵数量的确切指标。

利用钠泵的 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶 (E. C. 3、6、1、3) 能与哇巴因进行特异性结合的特点,用 ^3H -哇巴因对钠泵的特异性结合进行测定,可以作为膜上钠泵数量改变的指标。我们根据国内实验室条件改进了 Allen^[3] 等人的方法,选择了最优条件,为研究各种生理或病理条件下钠泵

(TNT)^[31] 灵敏度达到 10^{-17}M 。其次,是发光检测仪器的配套,一方面不断研制高灵敏度的单光子检测装置;另一方面为了满足一般临床监测需要,研制了操作简易,重复性好,一机多能的测定装置。进一步,计算机程序控制的自动化测试仪器以及可进行连续、微量检测的流动发光检测装置也正在研制和应用中。随着新的发光试剂和发光仪器的配套,CLIA 在基础研究与临床应用方面将不断有新的突破。

参 考 文 献

- [1] Roswell, D. F. and White, E. H.: *Methods in Enzymology*, vol. 57, pp. 409, 1978.
- [2] Schroeder, H. R., et al.: *Methods in Enzymology*, vol. 57, pp. 424, 1978.
- [3] Schroeder, H. R.: *Methods in Enzymology*, vol. 84, p. 303, 1982.
- [4] Collins, W. P. et al.: *Immunoassays for Clinical Chemistry*, pp. 373, 1983.
- [5] Schroeder, H. R. et al.: *Immunoassays: Clinical Laboratory Techniques for the 1980s*, p. 189, 1980.
- [6] Feder, N. J. J.: *Histochem. Cytochem.*, 18, 911, 1970.
- [7] Pronovost, A. D. and Baumgarten, A.: *Experientia*, 38, 304, 1982.
- [8] Thore, A.: *Science Tools*, 26, 30, 1979.
- [9] Arakawa, H. et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, 30, 3036, 1982.
- [10] Kohen, F. et al.: *Steroids*, 36, 421, 1980.
- [11] Kohen, F. et al.: *FEBS Lett.*, 104, 201, 1979.
- [12] Kohen, F. et al.: *Steroids*, 36, 405, 1980.
- [13] Kohen, F. et al.: *Basic Chemistry and Analytical Applications*, pp. 357, 1981.
- [14] Weerasekera, D. A. et al.: *Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research*, vol. 11, p. 185, 1983.
- [15] Lindstrom, L. et al.: *J. Steroid Biochem.*, 16, 577, 1982.
- [16] Kim, J. B. et al.: *Clin. Chem.*, 28, 1120, 1982.
- [17] Cheng, P. J. et al.: *J. Immunol. Methods*, 48, 159, 1982.
- [18] Patel, A. et al.: *Biochem. Soc. Trans.*, 10, 224, 1982.
- [19] Arakawa, H. et al.: *Anal. Biochem.*, 97, 248, 1979.
- [20] Arakawa, H. et al.: *Steroids*, 38, 453, 1981.
- [21] Konishi, E. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 12, 140, 1980.
- [22] Rote, N. S. et al.: *Infect. Immun.*, 27, 118, 1980.
- [23] Peterhans, E. et al.: *J. Immunol. Methods*, 47, 295, 1981.
- [24] Schroeder, H. R. et al.: *Clin. Chem.*, 27, 1378, 1981.
- [25] Pronovost, A. D. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 13, 97, 1981.
- [26] Stevens, P. et al.: *Immunoassays*, 205, 1980.
- [27] Pronovost, A. D. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 16, 345, 1982.
- [28] Allen, R. C. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 47, 679, 1972.
- [29] Gabig, T. G. et al.: *Superoxide Dismutase*, vol. II, 1, 1982.
- [30] Wood, W. G. et al.: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 20, 825, 1982.
- [31] Wannlund, J. et al.: *Anal. Biochem.*, 122, 385, 1982.

[本文于 1985 年 1 月 26 日收到]

数量提供了一个可行的方法。

材 料 和 方 法

1. 材料

(1) ^3H -哇巴因 (英国 Amersham 产品) 比活性 $32\text{ci}/\text{mmol}$; $55\text{mci}/\text{mg}$, 保存期为一年, 临用前稀释到 $50\mu\text{l}$ 等于 $0.5\mu\text{ci}$ 。

(2) 非标记哇巴因 (G-毒毛旋花素) (E. Merck 厂出品)。

(3) 混合纤维素微孔滤膜 (上海第十制药厂产) 孔径 $0.45\mu\text{m}$ 。

(4) 闪烁体 (PPO) (上海试剂一厂产) (POPOP) (上海试剂一厂产), 其他试剂均为国产分析纯。

2. 红细胞的分离及计数

根据 Jerry^[4] 和 Furukawa^[5] 方法改良处理。取正常成年人新鲜静脉血 2 毫升, 肝素抗凝, 经 500g 离心 10 分钟, 去除血浆及白细胞, 残余的红细胞用 140mM 氯化胆碱 6—8 毫升洗二次, 再以 50mM Tris-HCl ($\text{pH}7.4$) 缓冲液 6—8 毫升洗二次, 每次洗涤后 500g 离心 5 分钟, 得到洗净的红细胞。以含有 150mM NaCl、 11.1mM 葡萄糖和 10mM Tris-HCl ($\text{pH}7.4$) 缓冲液为介质, 制成 20% 的红细胞悬浮液。取少量稀释后, 用血球计数器在显微镜下计数。

3. ^3H -哇巴因结合保温

根据 Allen^[3]、Schmalizing^[6], 并结合 Dunhan^[7] 的方法进行改良。取红细胞悬浮液 $100\mu\text{l}$, 加入以相同介质稀释后的 ^3H -哇巴因 $50\mu\text{l}$ ($0.5\mu\text{ci}$ 相当于 15.5pmol) 及保温介质 $50\mu\text{l}$ 。每管反应液总体积为 $200\mu\text{l}$, 红细胞浓度为 10%, 每个样品均以双复管或三复管同时保温, 平行管加入 1,000 倍的非标记哇巴因 (排除非特异结合), 37°C 保温 60 分钟, 并不时旋转使充分混匀。反应毕, 以冰冷的 10mM Tris-HCl ($\text{pH}7.4$) 5ml 使红细胞溶解而终止反应。放置 5—10 分钟后, 在 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜上收集红细胞膜, 并用冷 10mM Tris-HCl ($\text{pH}7.4$) 洗三次, 每次 3ml 。取下滤膜于 80°C 烘箱中干燥 15 分钟, 置于闪烁液 (每 1000ml 甲苯中含有

PPO 4 克, POPOP 0.1 克) 中, 用 Beckman L. S. 8000 型液体闪烁计数器测 cpm。

4. 钠泵数量的计算方法

单个细胞上哇巴因受体即钠泵数目可按下式计算:

$$\frac{\text{cpm/ml 红细胞}}{\text{投料 cpm}} \times (0.5\mu\text{ci} \times 31\text{pmole})$$

$$\times 10^{-12} \times 6.023 \times 10^{23}/\text{ml 红细胞计数}$$

(注: (1) 投料量为 $31\text{pmoles } ^3\text{H}$ -哇巴因, 相当于 $1.0\mu\text{ci}$)

(2) cpm/ml 红细胞: 为每 ml 红细胞特异性结合的放射性计数由样品管 cpm/ml 红细胞—平行管 cpm/ml 红细胞得到)

结 果

1. 哇巴因浓度对结合反应的影响

为确定 ^3H -哇巴因与红细胞钠泵结合的饱和浓度, 我们以结合反应的介质配制一系列不同浓度的 ^3H -哇巴因稀释液, 各取 $100\mu\text{l}$ 与 20% 红细胞悬液 $100\mu\text{l}$ 混匀, 使各管 ^3H -哇巴因的浓度分别 10、20、30... 90nM , 于 37°C 保温反应 60 分钟, 收集红细胞膜测 cpm。计算每毫升红细胞所结合的 ^3H -哇巴因的 pmol 数, 并以浓度对结合的 pmol 值作图 (图 1)

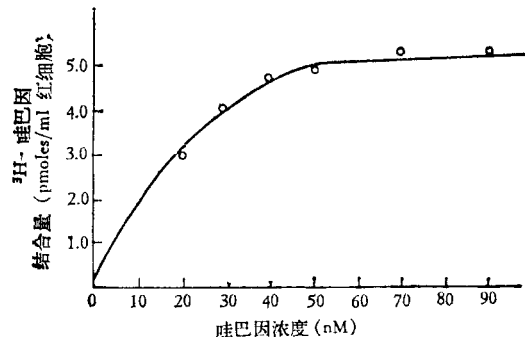


图 1 ^3H -哇巴因结合的浓度曲线

由图 1 可见, ^3H -哇巴因浓度为 50nM 时达到最大结合。通常我们用 70 — 80nM 的 ^3H -哇巴因, 可保证充分结合。

2. 保温时间对结合反应的影响

将 $80\text{nM } ^3\text{H}$ -哇巴因和 10% 红细胞, 分别保温不同时间, 测定红细胞膜上结合的 ^3H -哇

巴因量。以时间对每 ml 红细胞结合的 ^3H -哇巴因的 pmol 数作图(图 2),可见最大结合量是在反应 60 分钟时。

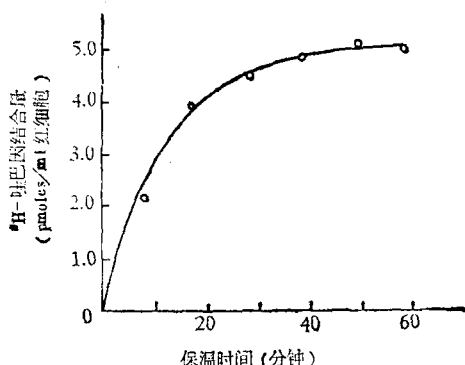


图 2 ^3H -哇巴因结合的时间曲线

3. 特异性曲线的制备

Hoffman 和 Ingram^[8] 指出 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶完全被抑制后,哇巴因分子还可继续结合到红细胞上,而在 K^+ 摄取被抑制后接上去的哇巴因实际上是非特异性结合,所以在求特异性结合曲线时,必需加入大量非标记哇巴因以排除非特异结合对计算受体的影响。

在一系列不同浓度 ^3H -哇巴因的反应管中分别加入 1000 倍以上的非标记哇巴因,并与不加非标记哇巴因而其他条件均相同的一系列反应管于同样条件下进行结合反应。以 ^3H -哇巴因的浓度对每 ml 红细胞所结合的 ^3H -哇巴因的 pmol 数作图(图 3)。

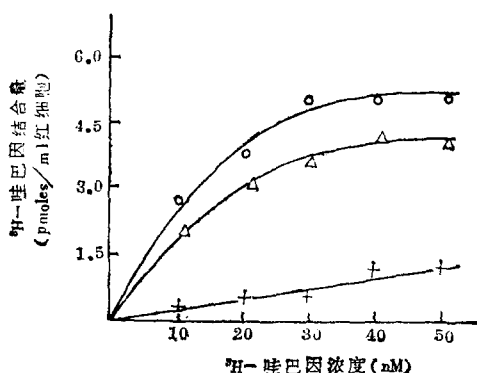


图 3 ^3H -哇巴因特异结合曲线

○——○ 总结合曲线 ×——× 非特异结合
△——△ 特异结合

4. 正常人及肝癌患者红细胞的钠泵数

根据最大特异性结合值,利用上述公式计算得人红细胞钠泵数量: 10 例正常成年人为 $429 \pm 24.53/\text{红细胞}$; 10 例 II、III 期肝癌病人为 $431 \pm 25.38/\text{红细胞}$; 两者经统计处理无显著差异。

讨 论

1. 红细胞分离方法虽然很多,但对 ^3H -哇巴因结合反应的影响并不大。要快速分离并洗净红细胞,必须把它保存在含有葡萄糖的无 K^+ 等渗介质中,使红细胞正常代谢有足够的能源,从而延长存活时间。放置过久的红细胞结合率显著降低;每 ml 新鲜红细胞的 ^3H -哇巴因结合量为 5.3 pmol,但放置 24 小时后,结合量下降至 2.1 pmol。

2. $[\text{K}^+]$ 对哇巴因和酶的相互作用的影响。在反应体系中,当 $[\text{Na}^+]$ 恒定时, ^3H -哇巴因对 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶的结合作用随 K^+ 浓度升高而降低^[9]。Hoffman^[8] 认为细胞外 K^+ 浓度达 30mM 时可以解除哇巴因的结合,而 Jerry 等人^[4] 则认为只是降低与哇巴因结合而不是完全解除。因此我们采用了无 K^+ 的介质保存红细胞。

3. Allen^[3] 用大鼠肾脏进行 ^3H -哇巴因结合反应。在我们实验中发现大鼠红细胞膜上 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶与哇巴因的结合极易逆转,用微孔滤膜过滤时,红细胞膜一经洗涤,哇巴因立即从膜上解离下来。如果不洗涤而收集红细胞膜,则混于膜中非结合的哇巴因又不能完全去除,会影响数据可靠性,甚至在未洗涤前,用低渗液溶解红细胞,也有部分 ^3H -哇巴因解离下来。因此应用大鼠红细胞膜测定 ^3H -哇巴因受体数(即钠泵数)难以得到可靠的结果。

4. 测定 ^3H -哇巴因的特异性结合时,非标记哇巴因浓度要比 ^3H -哇巴因大 1,000—10,000 倍,否则非特异性结合增高,难以得到真正的特异性结合数据。

5. 保温反应时间的选择十分重要,一定要有足够的时间确保充分结合,但保温时间过长,

人 C-反应蛋白的等电点的测定

吴蔚 宋晓国 丁玉珍*

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京)

人 C-反应蛋白 (CRP) 等电点的最早报道为 1954 年 Wood 等用自由电泳法测定为 4.82。我们在 1983 年用等电聚焦法测定^[2]为 5.2, 但在 pH 4.7 及 6.6 处亦有两条区带。后来看到 Laurent 等用滴定曲线法^[3]测 CRP 的 pI 为 6.3 ± 0.2, 但在 pH 7.2—8.5 间; 4.0—5.0 间亦有其等电点区, 后者可能为酸变性 CRP 的等电点。我们也用此法测定自制的并纯化了了的 CRP^[2]等电点, 所得曲线与报道相似, 但由于滴定曲线与样品槽在比较宽的 pH 范围内均非常接近, 交点 (即等电点) 不易读出, 因而我们改用了聚焦-免疫双向电泳法, 得到比较满意的结果。测得人 CRP 的等电点为 5.7—6.0, 在 pH 7.2—8.5 或 4.0—5.0 间, 均无区带出现。

材料与方 法

一、材料

1. 仪器 LKB 2117 Multiphor 电泳仪表面电极

又会使红细胞变形甚至溶血影响结合率。

6. 微孔滤膜孔径小于 0.3 μm, 过滤困难, 甚至微孔堵塞, 使数据偏高; 孔径大于 0.45 μm, 可能丢失部分膜碎片。根据我们的实验结果, 0.45 μm 孔径较适宜。此外还必须选用均一的薄膜, 并在使用前用洗涤介质中充分浸透。

用本法测定正常人和肝癌病人红细胞的钠泵数量, 结果可靠, 方法简便, 可作为研究各种病理条件下钠泵数量改变的指标。

参 考 文 献

- [1] Lindonmauer, G. E. et al.: *J. Biol. Chem.*, 248, 1291, 1973.

(LKB Multiphor Electrode 2117-111) 数字式 pH 计(Beckman Model 3500 Digital pH Meter)

2. 凝胶 (1) 含 2.5% 自制 Ampholine, pH 3.5—9 (由本所蒋滋慧教授赠与) 及谷氨酸, 天门冬氨酸, 赖氨酸和精氨酸各 2mM 的聚丙烯酰胺凝胶 (T = 6%, C = 2.3%)。

(2) 1% 琼脂糖凝胶, 内含 5mM EDTA 钠盐及兔抗人 CRP 血清 0.82ml/20ml 凝胶。

3. 电极缓冲液 73.2mM Tris-24.9mM 巴比妥-5mM EDTA 钠盐, pH8.6。

二、方法

1. 滴定曲线法 在制作凝胶平板模型的有机玻璃盖板上预先粘一条 8.5 × 0.1 × 0.1cm 的狭长有机玻璃条, 使制成的样品槽与长边平行, 位于两长边中间, 起点距短边 1cm 处。此模型板为 LKB 聚焦电泳仪的配件之一。以凝胶 1 制成

* 中国人民解放军总医院风湿科。

- [2] Skou, J. C.: *Physiol. Rev.*, 45, 596, 1965.
[3] Allen, J. C. et al.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 168, 42—46, 1969.
[4] Jerry, D. et al.: *J. Gen. Physiol.*, 60, 609, 1972.
[5] Furukawa, H. et al.: *J. Gen. Physiol.*, 76, 499, 1980.
[6] Schmalzing, G. et al.: *Life Science*, 29, 371, 1981.
[7] Dunhan, P. B. et al.: *J. Gen. Physiol.*, 58, 94, 1971.
[8] Hoffman, J. F. et al.: in "Proceeding of the First International Symposium on Metabolism and Membrane Permeability of Erythrocytes and Thrombocytes, Vienna, 420, 1968.
[9] Matsui, H. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 25, 147, 1966.

[本文于 1985 年 4 月 8 日收到]