

抗心律失常肽抗体制备及放射免疫分析法

孙雅贤 杨鸣岗*

(河北省医学科学院, 石家庄 050021)

孙阿成 王赋敏 周 峰

(海军总医院, 北京 100037)

提 要

将抗原性很弱的半抗原 AAP 与牛甲状腺球蛋白偶联, 采用淋巴结免疫法制得兔抗 AAP 抗体, 效价为 1:13600。AAP 分子结构中没有可与 ^{125}I 发生反应的酪氨酸或组氨酸残基, 我们用 3-(4-羟苯基)丙酸-N 琥珀酰胺酯做连接剂, 通过酰基键将酯连在 AAP 肽的末端氨基上, 再将 ^{125}I 标记在酯的羟苯基的 2,5 位置上, 成功地建立了 AAP 放射免疫分析法。

关键词 抗心律失常肽, 抗体, 放射免疫分析

抗心律失常肽 (Antiarrhythmic peptide, AAP) 是心脏的一种活性多肽, 具有强大的抗心律失常作用, 并能抑制血栓形成。AAP 目前已从牛心脏中分离出来且能人工合成^[1,2]。AAP 的研究工作是近些年才开始的, 国内尚未见此工作的报道。

本文用的免疫原是美国 Peninsula 实验室提供。分子量 470.56, 由 6 个氨基酸组成, 结构式: 甘-脯-羟脯-甘-丙-甘^[3]。本工作的目的在于制备优质的 AAP 抗体并建立放射免疫分析 (RIA) 方法。

1 材 料 和 方 法

1.1 材料

实验所用试剂除 AAP 是美国 Peninsula 提供, 牛甲状腺球蛋白及水溶性碳二亚胺, 3-(4-羟苯基)丙酸-N 琥珀酰胺酯为 Sigma 产品外, 一般试剂均为国产。

1.2 AAP 抗体的制备

4mg AAP 与 5 mg 牛甲状腺球蛋白溶解在 4ml pH 7.4 0.1mol/L 磷酸缓冲液中, 于磁力搅拌下向溶液中缓慢滴加 0.4% 的碳二亚胺 0.8ml, 放 4℃冰箱继续搅拌 20h。用冷磷酸缓冲液透析 3 天后备用。

上述液体与等量福氏完全佐剂混匀乳化, 采用淋巴结免疫法分期免疫健康雄性青紫蓝兔 (5—7 月龄, 体重约 2.5kg)。9 个月后耳静脉取血测效价, 颈动脉放血, 分离血清, 加 1/10000 叠氮钠, 以每安瓿 0.1ml 分装, 冰冻干燥, 置 -40℃冰箱保存备用。

1.3 AAP 的放射性碘标记

参照常規氯胺-T 碘化标记法及酰化试剂法^[4]略加改进。

首先将 3-(4-羟苯基)丙酸-N 琥珀酰胺酯和乙酸乙酯液按 1:1 比例混匀 (W:V) 并按每管 50 μg 酯分装冷干保存备用。向上述分装好的活化酯管中加入 1mg/ml 的 AAP 50 μl (0.1 mol/L pH 8.5 的硼酸缓冲液配制), 冰浴中振荡 15min, 再加 1mCi 的 Na^{125}I , 振荡混匀后加入 1mg/ml 的氯胺 T 液 0.1ml (0.05mol/L pH7.5 的 PBS 液配制), 磁力搅拌下反应 40s, 再加 2mg/ml 的偏重亚硫酸钠液 0.2ml (0.05 mol/L pH7.5 PBS 液配制), 反应 1 min 后过葡聚糖凝胶 G10 柱, 用 0.05mol/L pH7.5 的 PBS 液洗脱, 流速 0.1 ml/min, 部分收集器收

* 现调华北制药厂。

收稿日期: 1991-12-16

修回日期: 1992-03-09

集洗脱液 (2ml/管), ^{125}I 放免测量仪测定各收集管中 ^{125}I 放射性, 将放射性计数高的高峰管合并, 冷干, 低温保存备用。

1.4 实验标本处理

血清: 取新鲜血清, 加等体积 0.05mol/L 醋酸沸水中煮 10min 后 3000r/min 离心分离上清液供做实验。

组织: 以大鼠心房组织为例, 迅速取新鲜待测大鼠心房组织, 去血迹后称重, 剪碎放 0.05mol/L 醋酸 (约等于组织体积) 中, 沸水煮 10min, 组织匀浆器匀浆组织, 以 3000r/min 离心分离上清液供测定用。

1.5 放射免疫测定

测定缓冲液为 0.1mol/L pH 7.5 PBS (内含 25mmol/L EDTA, 0.5% BSA 和 0.01% 硫柳汞)

AAP 标准: 用测定缓冲液准确配制 AAP 标准液, 浓度为 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320ng/ml, 按常规放免测定法操作, 反应系统中包括 100 μl 抗体 (1:1000 稀释); 100 μl ^{125}I -活化酯-AAP (10000cpm), 标准及样品均为 100 μl , 载体蛋白为羊血清 IgG 或混合人血清, 反应总体积为 1.6ml, 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放时间为 20h 左右。反应结束后 3000 r/min 离心 15 min, 弃上清液用 FT-613 自动计算 ^{125}I 放免测量仪测沉淀的放射性。

2 结果与讨论

经鉴定 AAP 抗体结合率为 50% 时的效价为 1:13600 (图 1)。

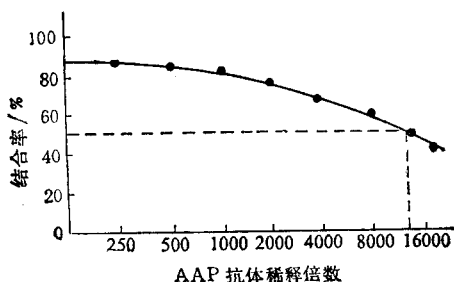


图 1 AAP 抗体滴度曲线

AAP 抗体与心钠素、强啡肽、亮氨酸脑啡

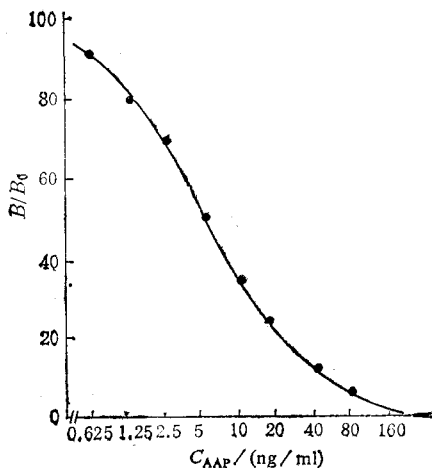


图 2 AAP 的 RIA 标准曲线

肽等无交叉反应, 用此抗体做的标准曲线灵敏度为 36pg (IC_{50}) (图 2)。

回收实验: 在已知鼠血清 AAP 含量的样品中分别加入 8ng, 16ng 标准 AAP, 再按测定 AAP 程序操作, 测得平均回收率分别为 107%, 102% ($n=3$)。

重复性及一致性实验: 同一份标本经醋酸及加热处理后在同一实验中做 3 管, 一致性很好, 在不同批实验中测试, 重复性稳定。

本文所用 AAP 抗原是人工合成的, 其氨基酸序列与 S. Aonuma 等人报导的从牛心房分离出的 AAP 的氨基酸序列相同。目前初步摸索我们所制备的兔抗 AAP 抗体可与人、猪、大鼠、小鼠有交叉反应, 说明这种氨基酸序列在不同种动物体内是存在的。

AAP 分子结构中没有可与 ^{125}I 发生反应的酪氨酸残基或组氨酸残基, 常规氯胺-T 法不易标记。本文用 3-(4-羟苯基)丙酸-N 琥珀酰胺酯做连接剂通过酰胺键将酯标记在 AAP 肽的末端氨基上, 再将 ^{125}I 标记在酯的羟苯基的 2, 5 位置上。此种连接技术尚未见报导。标记时酯很容易水解成 3-(4-羟苯基)丙酸, 所以在进行碘标记反应时, 务必迅速尽可能减少水解反应。

AAP 放免测定技术日本 Y. kohama 等人有报道^[1], 本文较其有许多不同之处。文献[5]中采用的碘标技术是先使 ^{125}I 与酯连接, 再与

AAP 肽连接, 制备的抗体是豚鼠抗 AAP (效价 1:8000), 一个实验周期为 48h. 本文除碘标技术与其不同外, 制备的抗体是兔抗 AAP (效价 1:13500), 效价较高, 在 24h 内即可出实验报告.

放射免疫技术测定 AAP 是敏感, 特异的方法, 此法的建立为科研工作者探讨 AAP 的分泌、代谢、分布等工作提供了灵敏的测试方法.

参 考 文 献

1 Aonuma S, Kohama Y, Akai K *et al.* Studies on heart.

XIX. Isolation of an atrial peptide that improves the rhythmicity of cultured myocardial cell clusters. *Chem Pharm Bull*, 1980; 28: 3332

2 Aonuma S, Kohama Y, Makino T *et al.* Studies on heart. XXIV. Inhibitory effect of antiarrhythmic peptide (AAP) on experimental thrombosis. *Chem Pharm Bull*, 1984; 32: 219

3 Aonuma S, Kohama Y, Makino T *et al.* Studies on heart XXI. Amino acid sequence of antiarrhythmic peptide (AAP) isolated from atria. *J Pharmacobio-Dyn*, 1982; 5: 40

4 李振甲等: 实用放射免疫学, 北京: 科学技术出版社, 1989: 45

5 Kohama Y, Kawahara Y, Okabe M *et al.* Determination of immunoreactive antiarrhythmic peptide (AAP) in rats. *J Pharmacobio-Dyn*, 1985; 8: 1024—1031

薄层扫描法测定寡核苷酸含量

王升启 马立人

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

张京生 石成华

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

提 要

建立了薄层扫描测定寡核苷酸含量的新方法, 与传统方法相比, 该方法具有简单、微量、样品间无交叉污染等优点, 该方法的线性方程 $Y = -155.7 + 0.1428X$, 相关系数 ($r = 0.9989$), 线性范围 (10—3000ng), 平均回收率 (97.33%) 及平均变异系数 (5.5%) 均属优良.

关键词 薄层扫描, 寡核苷酸, 高效薄层色谱

现代分子生物学技术的发展及 DNA 自动合成仪器的出现使人工合成寡核苷酸的应用范围越来越广, 目前, 它不仅可用作核酸测序引物、基因克隆接头、启动子及探针等, 而且在 PCR 技术中起重要作用^[1]. 近年来, 反义核酸技术的提出, 使 DNA 合成技术, 特别是大规模 DNA 合成技术显得更加重要^[2], 以上技术的发初迫切需要一种样品用量少、无交叉污染、灵敏度高、测定结果可靠且可分析混合组分中某一组分含量的寡核苷酸定量方法, 目前普遍采用的测定 DNA 含量的紫外比色法^[3]已不能满

足上述要求. 为此, 我们建立了一种寡核苷酸含量测定的新方法——薄层扫描法.

1 材 料 和 方 法

1.1 仪器和试剂

薄层扫描仪为日本岛津 CS-930, DR-2 型数据处理机, 紫外分光光度计为日本日立 557 型, 薄层色谱展开槽为瑞士 CAMAG 公司产品, 预涂高效薄层色谱板为西德 E. Merck 公司产硅胶 GF254. 薄层色谱展开剂为异丙醇:

收稿日期: 1991-12-30 修回日期: 1992-02-29