

# 血浆环化鸟苷一磷酸 (cGMP) 的 蛋白竞争结合分析法\*

上海第二医学院基础部同位素室  
上海中医研究所

环化腺苷一磷酸 (cAMP) 和环化鸟苷一磷酸 (cGMP) 广泛存在于各种组织和体液中, 是一对具有特殊意义的单核苷酸在细胞内起着调节生理机能和物质代谢的重要作用<sup>[1,2]</sup>。

cGMP 在细胞和体液中的含量远低于 cAMP, 测定较困难。目前可供选择的较好的测定方法主要有放射免疫分析法及以蛋白激酶为特异试剂的放射竞争结合分析法。一般来说, 放射免疫法灵敏度较高, 特异性较强, 样品处理较简便, 但抗体制备较复杂, 灵敏度的提高亦有赖于使用  $^{125}\text{I}$  标记物, 需经常制备。蛋白激酶的制备较简便, 通常用氚标记物, 一次制备可长期使用, 放射防护也较简单, 但对样品的纯度要求较高, 灵敏度则与用氚标记物的放射免疫法相差不多。有些体液 (如尿) 及组织 (如肺、小脑) 中 cGMP 的含量较高, 用蛋白激酶竞争结合分析法测定已有较成功的报道<sup>[3,4]</sup>。血浆 cGMP 含量甚低, 能否用此法作较准确的定量, 尚未见文献介绍。本文报道一种用蛋白激酶竞争结合分析法测定血浆 cGMP 含量的方法。

## 一、蛋白激酶的制备

文献报道用于此分析法的 cGMP 蛋白激酶从龙虾 (Lobster) 尾肌或野蚕 (如 *Antheraea pernyi*) 蛹的脂肪体中提取, 后者似略优于前者<sup>[4]</sup>。本工作从中国家蚕蛹中提取 cGMP 蛋白激酶。

取 80—200 只结茧三天的蚕蛹, 剖取脂肪体 (在体壁与小肠间), 加 3—4 倍体积的 4 mM EDTA 溶液 (含 5 mM 醋酸镁), 在组织捣碎机

中匀浆 2 分钟,  $27,000 \times g$  离心 20 分钟; 取上清液, 用 1N 醋酸调至 pH4.8, 停放 2 分钟后再离心 ( $27,000 \times g$  20 分钟), 取上清液, 用 1M pH 7.2 磷酸钾缓冲液调至 pH6.5; 然后加固体硫酸铵 (32.5 克/100 毫升), 边加边搅拌, 再以  $27,000 \times g$  离心 20 分钟; 将沉淀溶于相当于粗抽提液体积的磷酸缓冲液 (pH7.0, 5mM) 中, 并用同一缓冲液透析至无  $\text{SO}_4^{2-}$  析出, 最后再以  $27,000 \times g$  离心 30 分钟, 取上清液分装安瓿, 贮存于  $-20^\circ\text{C}$ , 备用。以上全部过程在  $0-4^\circ\text{C}$  中进行。

以不同量的酶液与 0.375 微微克分子  $^3\text{H}$ -cGMP 进行结合反应 (反应条件见“标准曲线”一节), 结合率随酶量增加而升高, 并渐趋平坦

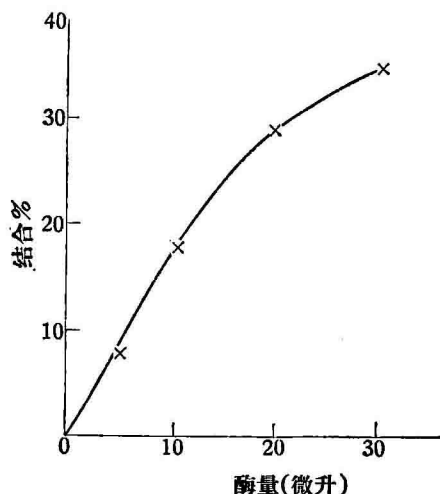


图 1 cGMP 蛋白激酶的饱和曲线

\* 本工作得到中国科学院生物化学研究所酶室及五室的大力支持, 特此致谢。

(图 1), 推荐的酶液用量为结合率 30% 左右。各批制剂中的蛋白含量不全相等, 在 43—76 微克/微升间, 选用体积时主要根据与  $^3\text{H}$ -cGMP 的结合率, 一般为每一反应管含蛋白 300—700 微克。

为了试验样品中 cAMP 对 cGMP 蛋白激酶的竞争性结合情况, 以  $^3\text{H}$ -cGMP 与酶液进行结合反应(条件见“标准曲线的制作”一节), 同时加入不同量的标准 cAMP 或 cGMP。结果表明, 酶液对 cGMP 有相对专一性, cAMP 需超过  $1 \times 10^{-7}\text{M}$  才起一定竞争性抑制作用, 与 cGMP 相差二个数量级(图 2)。

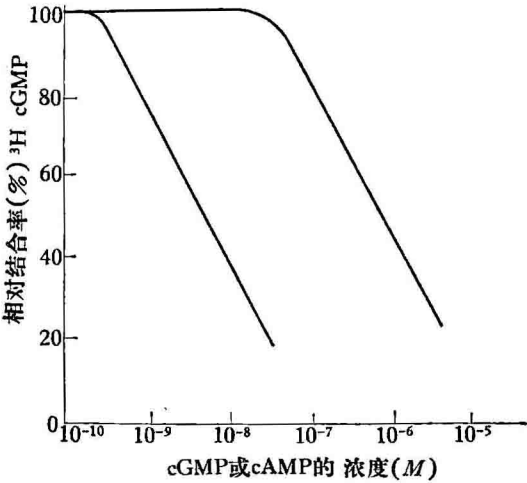


图 2 cGMP 及 cAMP 对  $^3\text{H}$ -cGMP 与 cGMP 蛋白激酶结合率的影响

二、标准曲线的制作

1. 试剂、材料、仪器

(1) 缓冲溶液 缓冲液甲: 200 mM 醋酸缓冲液, pH 4.0, 内含 EDTA 8 mM; 缓冲液乙: 缓冲液甲用水稀释 4 倍; 缓冲液丙: 5 mM 磷酸钾缓冲液, pH6.0。(2)  $8\text{-}^3\text{H}$ -cGMP 铵盐(RCC 商品) 15 居里/毫克分子, 使用时取所需量用惰性气体吹干, 再以缓冲液甲配成 0.375 微微克分子/20 微升。(3) 标准 cGMP 用  $\text{H}_2\text{O}$  溶解, 在 260 毫微米处读 O. D 数, 按克分子消光系数( $11.7 \times 10^3$ )计算配成 300 微微克分子/毫升,  $4^\circ\text{C}$  保存, 用时以缓冲液乙稀释至所需浓

度。(4) 微孔薄膜 孔径 0.45—0.65 微米(5) 闪烁液 对联三苯 (TP) 0.3% 或 2, 5-二苯基噻唑 (PPO) 0.4%, 1, 4-双-[2'-(5'-苯基噻唑)]-苯 (POPOP) 0.01% 或对-双-(邻-甲基苯-乙炔基)-苯 (bis-MSB) 0.03% 溶于二甲苯。(6) 液体闪烁计数器 对  $^3\text{H}$  的无淬灭效率约 65%, 对  $^3\text{H}$ -cGMP 在微孔薄膜上的效率约 30%。

2. 标准曲线的制作

取小试管 12 支, 在冰浴中按表 1 自左至右顺序加入各试剂, 加  $^3\text{H}$ -cGMP 后振摇 1 分钟, 加酶后再振摇 1 分钟, 然后  $4^\circ\text{C}$  保温 2 小时以上(2—14 小时无明显差异)。用缓冲液丙 1 毫升中止反应。在微孔薄膜上减压抽滤, 除去游离  $^3\text{H}$ -cGMP。用缓冲液丙  $2 \times 5$  毫升淋洗  $80^\circ\text{C}$  30 分钟烘干。将膜片投入测量杯底部, 加 5 毫升闪烁液测 cpm, 要求测量时间使统计误差被控制在  $\pm 5\%$  以内。

表 1 血浆 cGMP 蛋白竞争结合分析法的反应系统 (表中数字均为微升数)

| 类 别                                    |     | 反应管<br>编号 | 去离<br>子水 | 缓冲液<br>乙 | 标准<br>cGMP 用<br>缓冲液乙<br>稀释至<br>3p/100<br>微升 | $^3\text{H}$ -cGMP<br>用 缓冲液<br>甲 稀释至<br>0.375p/20<br>微升相当于<br>12500dpm | 酶* |
|----------------------------------------|-----|-----------|----------|----------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----|
| 空 白                                    |     | 1.2       | 10       | 100      | —                                           | 20                                                                     | —  |
| 标<br>(微<br>微<br>准<br>克<br>分<br>子<br>管) | 0   | 3.4       | —        | 100      | —                                           | 20                                                                     | 10 |
|                                        | 0.3 | 5.6       | —        | 90       | 10                                          | 20                                                                     | 10 |
|                                        | 0.9 | 7.8       | —        | 70       | 30                                          | 20                                                                     | 10 |
|                                        | 1.5 | 9.10      | —        | 50       | 50                                          | 20                                                                     | 10 |
|                                        | 3.0 | 11.12     | —        | 0        | 100                                         | 20                                                                     | 10 |
| 样 品                                    |     | 13.14     | —        | —        | 溶于缓<br>冲液                                   | 20                                                                     | 10 |
|                                        |     | —         | —        | —        | 乙的样品<br>100 微升                              |                                                                        |    |

\* 各批酶制剂含酶量不等, 所用体积也不同, 在 10—20 微升间选择

每一样品测得的 cpm 扣除空白管 cpm (一般都接近本底)再换算成 1000/cpm 或  $c_0/c_x$  (无非放射性 cGMP 时的 cpm 为  $c_0$ , 各样品的 cpm 为  $c_x$ ), 以所加标准 cGMP 量为横座标, 1000/cpm 或  $c_0/c_x$  为纵座标作图, 在一定范围内为一直线(图 3), 必要时用最小二乘法使标准曲

线的误差减到最小程度。

由图 3 还可看出,  $^3\text{H}$ -cGMP 的化学量越少, 标准曲线的斜率越高, 但同时使用范围越

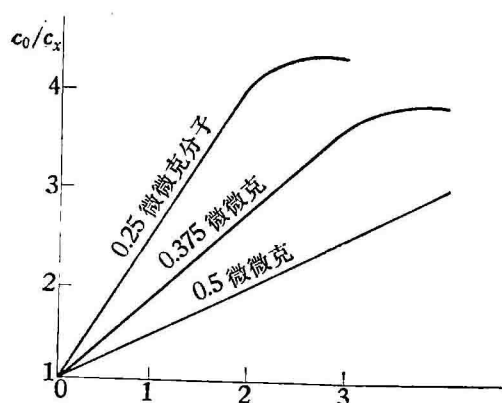


图 3  $^3\text{H}$ -cGMP 标准曲线  
线上数字为  $^3\text{H}$ -cGMP 化学含量

窄。为兼顾斜率(与灵敏度直接有关)及使用范围, 一般选用  $^3\text{H}$ -cGMP 的量为 0.30—0.40 微微克分子, 此时使用范围为 0—3 微微克分子,  $c_0/c_x$  在 3 微微克分子处为 3.0—4.0。

实验结果表明, 在表 1 所述条件下, 标准 cGMP 为 0.3 微微克分子时,  $c_0/c_x$  为  $1.34 \pm 0.034$  ( $n = 8$ ,  $\bar{x} \pm SE$ ), 与 0 微微克分子差异非常显著 ( $P < 0.001$ ), 亦即灵敏度(最小可测量) 0.3 微微克分子。

### 三、样品处理<sup>[3,9]</sup>

#### 1. 试剂、材料

阴离子交换树脂 Zerolit FFP (甲酸型, 200—400 目) 将市售 Cl<sup>-</sup>型树脂按常规用碱、酸处理后, 用 1N HCl (3—4 倍体积) 浸泡半小时, 去离子水洗至中性。然后用 1N 甲酸钠淋洗至无 Cl<sup>-</sup>流出。最后在去离子水中平衡备用。(2) 葡聚糖凝胶 (Sephadex G10) 用去离子水将干粉浸泡胀足, 临用前以 0.1mM 氨水淋洗, 再用去离子水淋洗。(3) 测回收用闪烁液 2-(4'-叔丁基苯)-5-(4'-联苯基)-1, 3, 4-噁二唑 (丁基-PBD) 或 2-苯基-5-(4'-联苯基)-1, 3, 4-噁二唑 (PBD) 0.8%, 萘 6%, 用二甲苯-乙

二醇甲醚 (6:4) 溶解。液体闪烁测量仪器及时间控制同前。

#### 2. 样品处理的步骤

(1) 分离血浆 每次静脉采血 2.5—3.0 毫升, 0.5M, pH7.5 EDTA 钠盐抗凝 (5—7 毫克分子/毫升全血), 立即在冰浴中冷却, 1 小时内 3,000 转/分离心 10 分钟, 分出的血浆在 -15℃ 保存, 2 周内测定。

(2) 血浆去蛋白质 每毫升血浆加 1N HClO<sub>4</sub> 0.5 毫升, 搅匀离心 (3,000 转/分, 10 分钟), 所得沉淀用 0.3N HClO<sub>4</sub> 0.5 毫升洗一次, 合并的上清液用 2N KOH 调 pH 至 6.0 左右, 离心 (3,000 转/分, 10 分钟) 除去 KClO<sub>4</sub> 沉淀。

(3) 阴离子交换树脂分离 cAMP 与 cGMP 将树脂装成 7 × 40 毫米小柱, 去蛋白的血浆滤液上柱, 10 毫升 H<sub>2</sub>O 洗, 2N 甲酸 8 毫升洗脱, 收集第 2 至第 5 毫升为 cAMP 部分, 再用 4N 甲酸 12 毫升洗脱, 收集第 5 至第 11 毫升为 cGMP 部分。将收集到的两部分真空干燥, 分别溶于 1 毫升 H<sub>2</sub>O 中。

(4) 葡聚糖凝胶除去 cGMP 部分的杂质 Sephadex G-10 装成 4 × 70 毫米小柱, 上样, 2 毫升 H<sub>2</sub>O 洗脱。收集到的 cGMP 部分真空干燥后溶于 0.5 毫升 50mM pH4.0 的醋酸缓冲液中。

(5) 蛋白质竞争结合反应 由离子交换树脂洗脱所得 cAMP 部分 1 毫升, 由葡聚糖凝胶柱洗脱所得 cGMP 部分 0.5 毫升分别取 2 × 100 微升进行蛋白竞争结合反应, 又分别取 400 微升及 200 微升用均相闪烁液测放射性计算回收率。

为检验阴离子交换树脂分离 cAMP 与 cGMP 的可靠性, 将一定量  $^3\text{H}$ -cAMP 及  $^3\text{H}$ -cGMP 按上述方法上柱洗脱, 测放射性定位, 得到两个明显分离的洗脱峰 (图 4) 若只加  $^3\text{H}$ -cAMP 或  $^3\text{H}$ -cGMP 则仅出现一个相应的洗脱峰。

cAMP 经一次层析分离的回收率平均 64% 左右。cGMP 经二次层析分离的总回收率平均 57% 左右。

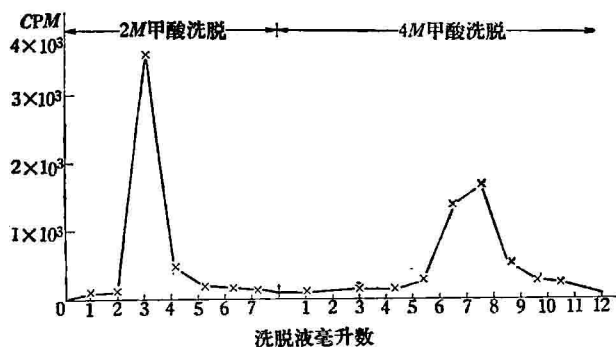


图4  $^3\text{H}$ -cAMP 与  $^3\text{H}$ -cGMP 的洗脱峰

#### 四、样品中 cGMP 的测定

上述处理好的样品按表 1 的条件与标准曲线各管同时进行竞争结合反应,并从标准曲线查得微微克分子数。在没有明显操作差错的情况下,复管变异系约 11—13%。

实际测量血浆样品时,取两个复管的 cpm 均值查得微微克分子数,再按下式计算:微微克分子/毫升血浆二查得的微微克分子数  $\times 5$ /回收%。

同一血浆(安瓿分装保存于  $-15^\circ\text{C}$ )多次

表 2 同一血浆 ( $-15^\circ\text{C}$  保存)不同时期测量的重复性

| 重复测定日期 | 测得值微微克/毫升 |
|--------|-----------|
| 6—14   | 4.91      |
| 6—17   | 4.58      |
| 6—23   | 4.21      |
| 6—27   | 4.58      |

测量的重复性见表 2。

6 次实验中样品中外加标准 cGMP 的回收率在 85.5—121% 间,平均 98%。

用本方法测定 36 例健康献血员(年龄在 20—50 岁间,男女约各半)的血浆 cGMP 和 cAMP 含量,结果与文献值基本一致,血浆 cAMP 的两种方法测定结果也基本一致(表 3)。

#### 五、讨 论

##### 1. 本工作的改进之处

蛋白竞争结合分析法采用蛋白激酶作特异结合试剂,原料易得,制备方便。标记物为  $^3\text{H}$ -cGMP,一次标记可长期使用(无外照射损伤,防护简便)。但灵敏度及专一性略逊于放射免疫分析法。而血浆中 cGMP 含量又很低,若按测定 cAMP 的常规方法操作,误差甚大。本实验所用方法主要从提高标准曲线、灵敏度及增加标本量两个方面进行改进。通过减少标记物用量,使标准曲线斜率提高,通过增加一倍标本量,使样品读数误差减小。从文中报道的对方法进行的考核结果来看,可以满足临床及科研工作的需要。测定样品的周期为 2—3 天,与一般放射免疫分析法相仿。

##### 2. 如何解决结合部分放射性偏低的问题

由于增加了标本量(相当于 0.2 毫升血浆/

表 3 正常值与国外文献比较<sup>(1)</sup>

|                       | cAMP 含量 <sup>(3)</sup><br>微微克分子/毫升 | cGMP 含量<br>微微克分子/毫升           | cAMP/cGMP<br>比值          |
|-----------------------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
|                       | $24.0 \pm 5.0 (n = 30)$            | $6.02 \pm 2.2 (n = 33)$       | $4.95 \pm 2.79 (n = 19)$ |
| 直接法 <sup>(2)</sup>    | $23.7 \pm 4.7 (n = 24)$            |                               |                          |
| Patterson W. D (1974) | $13 \pm 3.0 (n = 4)$               | $9.5 \pm 1.0 (n = 4)$ (酶环化法)  |                          |
| Hamet P (1975)        | 23 ( $n = 15$ )                    | $4.2 \pm 2.1 (n = 9)$         |                          |
| Goldberg M. L (1977)  | $24.1 \pm 6.6 (n = 9)$             | $4.3 \pm 1.0 (n = 9)$ (放射免疫法) |                          |

(1) 表中数据是  $\bar{x} \pm SD$  ( $n$  表示例数)

(2) 直接法是本组建立的不经层析分离直接测定血浆 cAMP 的方法,取 1 毫升 EDTA 抗凝的血浆加 100 微升酸化精(100 微升冰醋酸加入 3 毫升无水乙醇新鲜配制),  $80^\circ\text{C}$  加热 4 分钟,离心后取上清液直接进行竞争结合反应

(3) cAMP 的蛋白激酶竞争结合反应,所用 cAMP 蛋白激酶从牛肌中提取,  $^3\text{H}$ -cAMP (居里/毫克分子上海原子核研究所) 0.5 微微克分子/反应管;反应物含 BSA 0.05% 醋酸缓冲液, pH4.0 50mM. EDTA 2mM. (均为最终浓度),其它条件及操作步骤与 cGMP 相同

## 书刊介绍

### 1933—1975 年分子生物学诺贝尔演讲集介绍

诺贝尔奖基金会把 1933—1975 年有关分子生物学方面荣获诺贝尔生理学 and 医学奖项目的学者,在授奖仪式上所作讲演的讲稿汇编成集,于 1977 年出版,并由 1975 年的获奖者之一, D. Baltimore 撰写了前言。

这本文集收集了 1933 年至 1975 年获奖的科学家所作的 26 篇讲稿,从中可以看到分子生物学作为一门独立的学科,所经历的发展过程,以及在这一领域中,

这些在学术上获得最高荣誉的实际工作者之间的相互联系。他们在同一领域内共同工作,思考着类似的问题,相互补充着想法和实验,使科学探索的共同目的成为不断发展的课题。随着研究工作的不断深入,出现了许多重要的实验线索,例如,人们对辐射实验在基因研究中重要意义的重视不断增加,为理解功能问题,而必须去掌握详细的结构情报,以及采用若干像噬菌体这样的简单实验系统在阐明某些重要问题所起的核心

管),如仅用阴离子交换树脂作一次分离,结合部分的放射性常偏低,查得的微微克分子数偏高。这一现象的原因,无现成资料可查。但文献中曾有报道多数无机盐含量过多可抑制 cAMP 蛋白激酶的结合力<sup>[8]</sup>,也有报道相等于生理盐水中浓度的 NaCl(145 mM)可使 cGMP 蛋白激酶的结合力降低 35%<sup>[12]</sup>。另有作者报道, cGMP 样品中过多的无机盐可用葡聚糖凝胶除去<sup>[9]</sup>。本文介绍的方法中加用葡聚糖凝胶后上述结合力降低的现象不再出现。由此推测,上述结合率被抑制的原因很可能是由于增加了血浆用量使反应液中无机盐过多所造成。

#### 3. 采用微孔薄膜固相法测量

cAMP 和 cGMP 的蛋白竞争结合分析法最后一步分离游离和结合部分的方法很多。cGMP 的结合部分放射性低,需要取全部结合部分进行测量,并尽量提高探测效率。本文采用国产微孔薄膜固相测量,闪烁液及测量杯可重复使用,可明显节省人力物力,空白管计数率接近本底,测量误差已经过考核<sup>[10]</sup>,配用高灵敏度的液体闪烁计数器,计数效率也可满足要求。

#### 4. 操作注意事项

cGMP 的蛋白竞争结合分析法测定的量在 0.3—3 微微克分子间,对操作的要求较高。日常工作中考察操作可靠性的指标之一是复管变异。本文报道在没有明显操作差错时的复管变

异系数为 11—13% 左右。实践中体会,为了减少操作误差,主要需注意以下几点: (1) 全部操作在冰浴中进行; (2) 加试剂的程序必须固定,加特异试剂前后必须两次振摇混匀; (3) 血浆样品在 -15℃ 下保存期不超过两周为宜; (4) <sup>3</sup>H-cGMP 用缓冲液稀释后必须始终保存于 0—4℃,使用期不宜超过 1 周; (5) 标准 cGMP 应以浓溶液(30 微微克/100 微升)保存于 0—4℃,约可使用一个月,稀释的应用液每次新鲜配制; (6) 微孔薄膜干燥保存,用前先以缓冲液丙浸泡至少 2 小时。

#### 参 考 文 献

- [1] Golderg, N. et al.: *Proc. 5th Internat. Congr. Pharmacol.*, Basel, Karger, Vol. 5, p. 146, 1973.
- [2] Tare, S. and J. Bokaert: *Physiol. Rev.*, 55, 489, 1975.
- [3] Murad, F. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 68, 736, 1971.
- [4] Fallon, A. M. and G. R. Wvatt: *Anal. Biochem.*, 63, 614, 1975.
- [5] Patterson, W. D.: *Endocrinol.*, 95, 325, 1974.
- [6] Mamet, P.: *J. Clin. Invest.*, 56, 339, 1975.
- [7] Goldberg, M. L.: *Clinical Chem.*, 23, 576, 1977.
- [8] Albano, J. D. M. et al.: *Anal. Biochem.*, 60, 130, 1974.
- [9] Mao, C. C. and A. Guidotti: *Anal. Biochem.*, 59, 63, 1974.
- [10] 中国科学院生物化学研究所,上海第二医学院:《生物化学和生物物理学报》1976 年第 8 期第 169 页。

[本文于 1978 年 2 月 23 日收到]