

参 考 文 献

- [1] Hearn, M. T. W., *J. Liquid Chrom.*, **3**, 1255, 1980.
- [2] Krummen, K., *J. Liquid Chrom.*, **3**, 1243, 1980.
- [3] Bishop, C. A. et al.: *J. Liquid Chrom.*, **4**, 661, 1981; 599, 1981.
- [4] Hearn, M. T. W. et al.: *J. Liquid Chrom.*, **4**, 1725, 1981; 4, 1745, 1981.
- [5] Medermott, J. R.: *J. Chrom.*, **222**, 371, 1981.

- [6] Gyula Vigh, *J. Chrom.*, **236**, 51, 1982.
- [7] Kemp, M. C., *J. Liquid Chrom.*, **4**, 587, 1981.
- [8] Patricia Stricker, M., *J. Liquid Chrom.*, **4**, 1765, 1981.
- [9] Bohlen, P.: *J. Chrom.*, **205**, 65, 1981.
- [10] Bishop, C. A., *J. Chrom.*, **192**, 222, 1980.
- [11] Ohare, M. J., *J. Chrom.*, **171**, 209, 1979.
- [12] Rivier, J. E., *J. Liquid Chrom.*, **1**, 343, 1978.

〔本文于1983年2月23日收到〕

高灵敏度($10^{-15}M$)的 cGMP 放射免疫测定法

——A 蛋白 为 分 离 试 剂

贺师鹏 葛韵琴 张孙曦 魏莫愁

(北京医学院生物物理教研室)

1972 年 Steiner 首次创立了 cAMP 及 cGMP 的放射免疫测定法^[1],接着 Cailla^[2]及 Brooker^[3]先后又建立了 cAMP 的琥珀酰化及 cGMP 的乙酰化方法,因此把测量灵敏度提高了 40—100 倍,使 cGMP 的测量灵敏度达到 $10^{-15}M$ 水平。用这种方法能成功地测量某些 cGMP 含量极低的生物样品,如肝细胞,脂肪细胞等。

本文详细报道 cGMP 的抗血清, ^{125}I -TME-ScGMP 的制备,以及用 A 蛋白做分离剂的 cGMP 的放射免疫测定方法。

材 料 和 试 剂

(1) cGMP, ScGMP, TME-ScGMP。(2) EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl Carbodiimide-HCl)。(3) 反应缓冲液: 50 mM, pH 4.75 醋酸钠缓冲液(内含 4mM EDTA)。(4) T. N. E. T. 缓冲液(50mM pH7.4 tris-HCl 缓冲液, 0.9% NaCl, 50mM E. D. T. A., 0.02% NaN_3 , 0.05% Triton X-100)。(5) 5% A 蛋白: 每支干品(上海生研所产品),用 2ml T. N. E. T. 缓冲液悬浮, 3000r.p.m 离心 10 分钟,弃上清,沉淀再用 2ml T. N. E. T. 缓冲液洗一

次。最后将沉淀悬浮在 6ml T. N. E. T. 缓冲液(内含 2mg BSA/ml T. N. E. T.) 中。

方 法 和 结 果

一、免疫抗原 (BSA-ScGMP) 的合成

依 Steiner 方法^[1],将 50 mg ScGMP 溶于 3ml 蒸馏水中,用 $0.2M Na_2HPO_4$ 调 pH 至 5.4,然后加 100mg BSA,使其全溶。速加 50mg EDC,不断搅拌,此时溶液 pH 为 5.8,小心用 $0.2M Na H_2PO_4$ 调 pH 至 5.4。将反应液在室温暗处放 18 小时后再装入透析袋内,冰箱透析 48 小时。透析液是 10mM pH7.4 的 pB 液(内含 0.15M NaCl)。透析期间更换几次透析液。透析完毕取出产品,分装,冷冻干燥后备用。

充分透析后的产品,再过 Sephadex-G 25 柱,流出液只出现一个蛋白峰,无小分子峰。将透析产品和柱层析产品分别做紫外吸收曲线,得图 1A、B。两产品的特征吸收光谱完全一样,产品具有 BSA, ScGMP 紫外吸收特性,又不同于 BSA 和 ScGMP,其中差异最显著的是最小吸收的波长,BSA 在 $2510 \text{ \AA}$, ScGMP 在 2220

Å, 而 BSA-ScGMP 则在 2450 Å。

根据产品在 2800 Å 及 2600 Å 处吸收值,按 Warbug 算法^[4],估计每个 BSA 分子接上 9.8 个 ScGMP 分子。

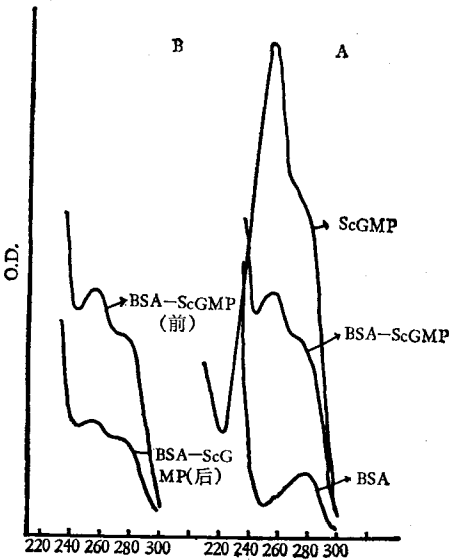


图 1

A: 透析后 BSA-ScGMP 与 BSA, ScGMP 紫外吸收曲线
B: 柱层析前后 BSA-ScGMP 紫外吸收曲线

二、抗体的制备与鉴定

1. 抗体的制备 取体重为 4 斤左右的家兔 4 只, 每只兔子基础免疫抗原剂量 1mg/ml (抗原先溶于生理盐水中, 再和等量完全福氏佐剂制成乳剂), 背部多点注射。三周后第一次追加, 抗原量同前。以后每月加强免疫一次。共加强三次, 其中 2 只兔子抗血清的滴度达到使用要求。

2. 抗血清质量鉴定 抗血清滴度曲线 用三种不同的标记抗原 (³H-cGMP: 15 居里/mM, 乙酰-³H-cGMP: 15 居里/mM, ¹²⁵I-TME-ScGMP 约 300 居里/mM), 它们的滴度曲线见图 2, ³H-cGMP 标记抗原时, 抗体滴度为 1:350, 乙酰-³H-cGMP 为标记抗原时, 抗体滴度为 1:1300, 以 ¹²⁵I-TME-ScGMP 为标记抗原时, 抗体滴度为 1:20,000。由此可见, 同一抗体, 在相同的反应条件下, 由于标记抗原结构不同, 比放射性不同, 造成滴度极大的差异。其部分原因可能是抗体的不均一性, 它们对不同结构的抗

原亲和性不一样, 因为乙酰化和琥珀酰化抗原分子与免疫抗原分子更为相似, 所以容易和抗体分子相结合。

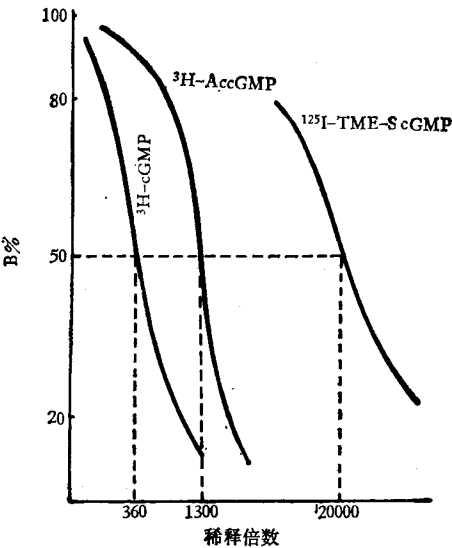


图 2 cGMP 抗血清稀释曲线

抗体的特异性 图 3 是 cAMP 与 cGMP 抗血清的交叉反应图, 由图中可知, 两种抗血清的交叉反应率为 0.0318%。

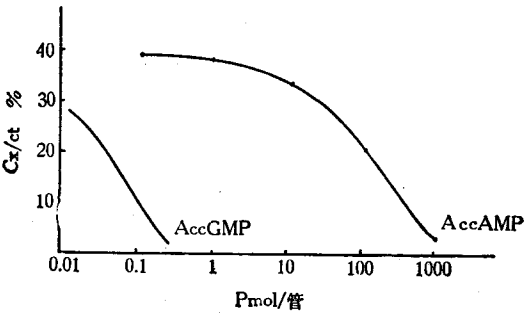


图 3 cAMP 对 cGMP 抗血清的交叉反应

三、¹²⁵I-TME-ScGMP 标记抗原的制备

TME-ScGMP 的碘化用氯胺-T 法, 具体步骤如下: 取 1.04 微克 TME-ScGMP 加 0.02ml 0.5M pH7.5 磷酸缓冲液, 加入 2 毫居里放射性 ¹²⁵碘, 迅速加入 300 微克氯胺-T, 反应一分钟后, 加偏焦亚硫酸钠 800 微克终止反应。反应产品用纸层析法分离纯化, 展开剂为正丁醇: 冰醋酸: 水 = 12:3:5。¹²⁵I-TME-ScGMP 的 Rf = 0.55—0.6 之间。碘化反应的标记率为

20—44%。产品的放化纯大于95%。图4是分离¹²⁵I-TME-ScGMP的放射层析图。

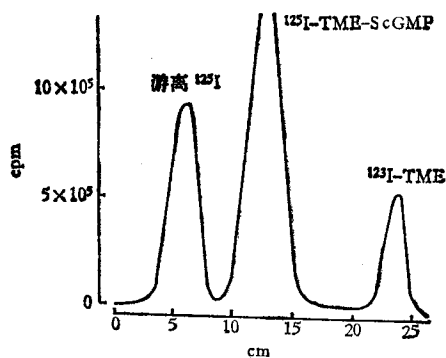


图4 ¹²⁵I-TME-ScGMP 放射层析图

四、cGMP 放免测定法

按表1顺序在冰浴中加入各试剂，最后将反应物摇匀，然后在4℃冰箱中保温18—24小时。第二天加入配好的5% A 蛋白溶液0.15 ml，室温反应30分钟，3500rpm 离心10分钟，弃上清，测量沉淀的放射性。不加标准 cGMP 计数记为 B₀ 管，加标准 cGMP 或样品管计数记为 B_x 管；扣除空白后的 B_x/B₀ 值为纵坐标，标准 cGMP 对数值为横坐标作图，得反 S 型曲线。表2是十条标准曲线的平均值。

表1 cGMP 放免反应加样顺序

项 目	空白管 μl	零标准管 μl	标准管 μl	样品管 μl
反应缓冲液	200	100	—	100
cGMP 标准	—	—	100	—
样 品	—	—	—	100
乙酰化试剂	6	6	6	6
¹²⁵ I-TME-ScGMP	100	100	100	100
抗血清	—	100	100	100
混匀，4℃冰箱放置18—24小时				
5% A 蛋白	150	150	150	150
混匀，室温放置30分钟				
3500rpm 离心10分钟后吸去上清				
沉淀测放射性				

表中乙酰化试剂：三乙胺：醋酸酐 = 2:1。抗血清用含 BSA 1mg/ml 的反应缓冲液稀释。¹²⁵I-TME-ScGMP 用反应缓冲液稀释，每管加8000—10000 cpm。

表2 10 根标准曲线平均值和标准误

标准 cGMP f mol	B _x /B ₀ ×100% ($\bar{x} \pm S.E.$) n = 10
12.5	88.1±1.00
25.0	78.4±1.98
50.0	68.8±2.3
100.0	57.5±2.2
200.0	44.7±2.2
400.0	32.0±1.8
800.0	23.3±1.5

五、方法学的检验

1. 灵敏度 以10对零标准的2倍标准差计算。由于灵敏度与方法的精密度及标记抗原比放射性等因素有关，本方法灵敏度为5—10 f mol。

2. 精密度 (a) 标准曲线的精密度按 Cerceo^[5]法计算，四次实验平均值为1.8%，(b) 批内变异：同一标本的5对复管其变异系数为4.7%，(c) 批间变异：同一标本三次测量变异系数为4.5%。

3. 准确度 对同一样品分别外加50，100，200，400 f mol 标准 cGMP，回收率为91.8% (100%—77.5%)。

4. 健全性试验 一个大鼠血浆样品，经处理后，分别取100，75，50，25 μl 测量值为260，180，120，65 f mol 的样品，它们的线性关系良好(见图5)。

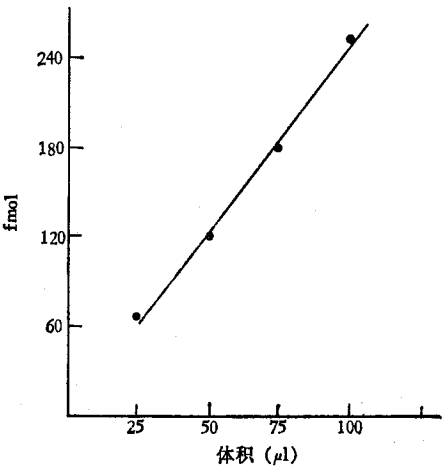


图5 样品稀释曲线

六、样品测定

1. 血浆样品 正常人静脉采血, 加 1% 血量的 EDTA 抗凝 (0.5M pH7.5), 立即在冰浴中冷却, 3000rpm 离心 10 分钟, 分离血浆。1 份血浆加 3 份无水乙醇, 沉淀蛋白, 离心, 取上清液。沉淀再用 75% 乙醇洗一次, 合并上清液, 65℃ 以下水浴吹干。测定前加一定量反应缓冲液溶解, 取 0.1ml 测定。正常人血浆 cGMP 含量 5.74 ± 0.31 P mol/ml ($n = 20$)。大鼠、小鼠血浆均可同法处理。大鼠血浆 cGMP 含量 18.56 ± 2.80 P mol/ml ($n = 13$)。

我们还比较了正常人血浆制样体积对结果的影响, 0.4ml 与 0.1ml 血浆制样, 所得结果无明显差异, 变异系数 $< 5\%$ 。因此本法用 0.1ml 正常人血浆即可测量。

2. 心脏组织 取心肌组织 20 mg—50 mg 加 3ml 冷冻的 10% TCA 匀浆, 3000rpm 离心 10 分钟, 取上清液, 沉淀再用 1ml 10% TCA 洗一次。合并两次上清液, 加 3ml 水饱和的乙醚提取 4 次, 将 TCA 提取后的上清液 1ml 放于 10 ml 小烧杯中, 65℃ 以下水浴吹干。测定前加 1ml 反应缓冲液溶解, 取 0.1ml 测定。

正常蟾蜍心肌 cGMP 含量: 0.14 ± 0.02 P mol/mg 湿组织。

讨 论

1. A 蛋白的用量 A 蛋白是某些金黄色葡萄球菌细胞壁的蛋白成分, 它有与 IgG 相结合的能力, 因此可代替第二抗体用。它的用量和结合率, 非特异性结合 (NSB) 的关系见表 3。

表 3 A 蛋白浓度、结合率、NSB 的关系

A 蛋白浓度 (%)	结合率(%)	NSB%
1.25	30.7	1.3
2.50	30.3	2.0
5.00	30.3	2.3
10.00	30.8	3.6

由表 3 可知, A 蛋白浓度在 1.25%—10%, 其结合率均在 30% 左右, 而 NSB 随着 A 蛋白

浓度加大稍有增加, 因此选 5% 浓度 A 蛋白既能使抗原-抗体复合物沉淀完全, 又使 NSB 值不高。用 A 蛋白做分离试剂, 实验周期缩短, 离心沉淀完全, 稳定性好, 操作方便。

2. 抗血清和 125 I-TME-ScGMP 保存问题 抗血清稀释成 1:500 后, 分装保存在冰盒中, 临用前再稀释成需要的稀释度, 保存时间和结合率关系见表 4。

表 4 抗体保存时间和结合率关系

测定日期	结合率 %
1982 年 4 月 2 日	50.8
4 月 14 日	48.5
4 月 17 日	50.4
4 月 24 日	51.1
5 月 7 日	40.6

抗体 1:500 稀释, 冰盒分装保存, 三周结合率不变, 第四周开始下降。在三种条件下, 125 I-TME-ScGMP 保存 1.5 月后, 其游离率和结合率变化见表 5。 125 I-TME-ScGMP 结合率变化不大, 125 I 游离率以 1mg/BSA 条件下最低。

表 5 125 I-TME-ScGMP 在三种保存条件和结合率、 125 I 游离率关系

保存条件	125 I-游离率%	结合率%
纸片	7.2	52.7
1mg/ml BSA	2.0	52.2
10% 正丙醇	3.9	49.0

贾战林、刘晨江、白俊海、张秀娟参加部分技术工作。

参 考 文 献

[1] Steiner, A. L. et al.: *J. Biol. Chemistry*, **247**, 1106, 1972.
[2] Cailla, H. L. et al.: *Anal. Biochem.*, **56**(1): 394, 1973.
[3] Brooker, G. et al.: *J. Cyc. Nuc. Res.*, **1**. 207. 1975.
[4] Dawson, R. M. C. et al.: *Data for Biochemical Research*. **625**, 1969.
[5] Cerceo, B.: *Lab. pract.*, **23**, 625. 1974.

(本文于 1983 年 1 月 15 日收到)