

为了提高吸附剂对欲分离物的吸附量,一般采用上样时流速慢或通过一定体积(约柱体积的1/3—2/3)样品液后静止一段时间,使吸附剂和欲分离物进行充分的反应,再行洗脱。

三、Con. A-Sepharose 亲和吸附剂上配体量的测定方法不少,本文采用计算法和测量法^[3],其结果有一定差异,这可能是由以下原因造成的:①测定时丙种球蛋白还未完全饱和(见图2)。丙种球蛋白溶解度低,当上样量相同(浓度一定)时,随着体积加大反应时间的延长,使亲和吸附剂在充分吸附丙种球蛋白的同时,增加了对非特异蛋白的吸附,从而使洗脱时间拖长,特异吸附物的洗脱量降低(见图5)因此,用测定法求出配体量低于计算法。③配体 Con. A 来源和位阻效应的影响,Con. A 的活力与刀豆

的品种及新鲜程度有密切关系(见图6)。

四、虽然 Con. A 与某些含有甘露糖、葡萄糖或果糖的糖蛋白能特异地结合,但是,由于糖蛋白中单糖的组份、含量和位置的差异,致使 Con. A 与其结合的亲和力也产生差异(见图1)

此外层析柱的再生方法,直接影响吸附剂的稳定性。有人^[4]用1M NaCl 进行再生,结果活性丧失1/3;有人^[5]用逐渐降低盐和糖苷的浓度进行再生,结果操作麻烦,成本昂贵。本文叙述的再生方法,不但稳定性和重复性都好,而且简便、廉价、活性几乎不受影响。

参 考 文 献

- [1] Banard, B. et al.: *Biochem. J.*, **183**, 213, 1979.
- [2] Latner, A. L. et al.: *Anal. Biochem.*, **101**, 483, 1980.
- [3] Steven, C. M.: *Anal. Biochem.*, **60**, 149, 1974.
- [4] Lloyd, E. O.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **137**, 460, 1970.
- [5] Surolia, et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **404**, 83, 1975.
- [6] Hilmae, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **235**, 2117, 1960.
- [7] 北京大学制药厂编:《微生物学和酶学基本知识》p 213, 1971.
- [8] 赵永芳等:《生物学简讯》武汉大学生物系编, **2**, 15, 1982.
- [9] Klene, R. et al.: *Mol. Immunol*, **16**, 421, 1979.
- [10] Klene, R. et al.: *Amino-acids peptides and proteins*, **8**, 167, 1976.

[本文于1983年3月29日收到]

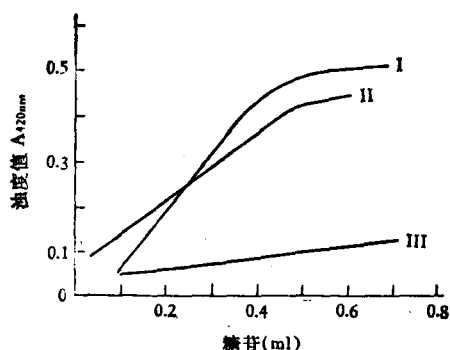


图6 不同类型刀豆的 Con. A 活力比较曲线
I、新鲜白刀豆 II、新鲜红刀豆 III、陈旧的红刀豆

一种简化的人血浆徐缓激肽放射免疫测定法

彭启明 李家芬 刘素媛

(中国医科大学, 沈阳)

徐缓激肽 (Bradykinin, 简称 BK) 是一种具有很强生物活性的九肽, 它是由血浆激肽释放酶作用于激肽元(属于 α_2 -球蛋白)使之水解而释放的。实验证明, BK 参与许多重要的生理及病理过程。它可使回肠、子宫及支气管平滑肌收缩, 使十二指肠舒张; 具有很强的扩血管作用, 与血管紧张素共同调节微循环。它还与

凝血因子有关, 特别值得提出的是它作为炎症的介质参与许多病理过程。研究 BK 的这些作用, 对于深入了解中毒性休克、冠心病、高血压以及肺、肾等器官病变, 将有重要意义。通常血中有两种很强的酶(生成 BK 和破坏 BK 的酶), 所以 BK 的代谢极快, 半衰期仅为 16 秒, 因而使血中 BK 的测定十分困难, 国外曾采用多种

层析及抽提方法提取它,但回收率低。本文介绍一种分离快、测定灵敏而特异的方法,适用于各种研究及临床工作。

一、材料及方法

1. BK 抗血清的制备

BK 分子量为 1074, 是低分子小肽, 本身无抗原性。我们将 BK 偶联在卵清蛋白上, 增加其抗原性, 具体步骤如下: 取合成 BK 三醋酸 (Sigma 产) 9 mg, 溶解在 0.9 ml 8 M 尿素及 0.1 ml 0.1 M pH 7.2 磷酸盐缓冲液的混合液中, 冷却到 4℃, 加入 25 μ l 甲苯 2, 4-二异氰酸盐。再加入 20 mg 卵清蛋白/0.75 ml 50 mM 硼酸钠, 将以上混合液于 45℃ 用磁力搅拌器搅拌, 反应 2 小时后用 0.1 M 碳酸铵 500 ml 透析, 30 小时换透析液三次, 再用水透析 24 小时, 取出分装, 冷冻干燥。

将以上制得的冻干品 5 mg 溶解在 2.5 ml 等渗盐液中, 用等量福氏佐剂乳化后, 选择杂种雄性白兔 5 只, 体重 1.5—2.0 kg, 进行免疫实验, 每月一次皮内多点注射, 三个月后强化注射一次, 一周后颈动脉放血, 分离出血清, 测定其效价, 2 只兔产生特异性抗体, 可用它测定生物体液内的 BK, 其中一只兔的抗血清最终稀释度为 1:70,000, 高于国内外文献报道的结果^[1,2]。

2. 用 125 I 标记 Tyr⁸-BK

BK 分子中不含酪氨酸, 其 5 位, 8 位是苯丙氨酸。我们用 Tyr⁸-BK 同系物进行碘标。(Tyr⁸-BK 由上海高血压所赠与, 德国产, 125 I Na 北京原子能所产) 用氯胺 T 法标记。5 μ g Tyr⁸-BK 加 1.5 mci 125 I Na (参照上海高血压所标记法)。标记后用 DEAE-Sephadex A. 50 (柱 45 $\times$ 2 cm) 进行纯化 (见图 1)。第一峰为单碘 BK (主峰), 测得碘利用率为 65%, 比放射性大于 195 ci/g, 接近国外报道的数值^[3]。将主峰的尖部一管 (约 3 ml) 分装保存于 -20℃, 可使用一个多月。

3. BK 标准品, 系 Sigma 产品

4. 血浆 BK 样品的制备及测定

(1) 血样收集 用 5 ml 冷塑料注射器, 内

装 0.1 ml 抗凝抑制剂 [含 3.6 mg 聚凝胺 (Sigma 产), 9 mg 乙二醇四乙酸二钠], 静脉采血 5 ml, 注入塑料管内立即于 4℃ 3,000 rpm 离心 10 分钟, 分离血浆。

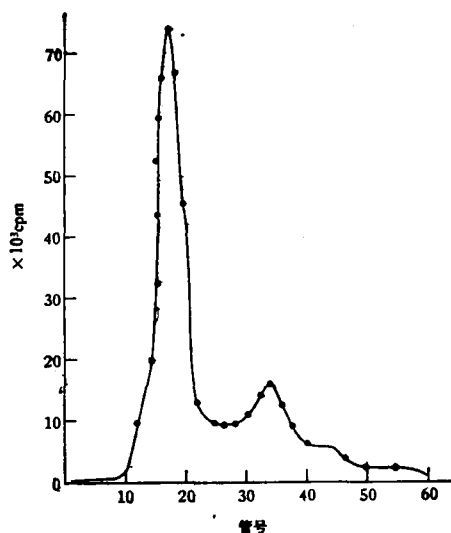


图 1 125 I 标记 Tyr⁸-BK 的 DEAE Sephadex A. 25 柱层析洗脱图

(2) 血 BK 分离 塑料层析柱 (8 $\times$ 1.5 cm) 内填充 Sephadex G. 25, 床高 5 cm, 床体积 9.1 ml, 用测定缓冲液 (每升含 100 mM Tris, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 g 聚凝胺, 1 g γ -球蛋白) 30 ml 洗柱达到平衡。取 2 ml 血浆上柱, 记录流出液体的体积, 用 BK 测定缓冲液洗脱, 收集第 7—10 ml 流出液, 混合后取 0.4 ml 做放射免疫测定。血 BK 分离的全过程均在 4℃ 进行。分离层析图见图 3。

(3). BK 放射免疫测定

a. 竞争性抑制曲线的制作 RIA 测定体系于 40 $\times$ 10 mm 塑料管中进行反应, 所有标准及稀释溶液均用测定缓冲液配制, 临用前稀释。标准 BK 浓度从 25 pg—3200 pg/50 μ l, 每一浓度均做复管, 待测 BK 加样 0.4 ml, 反应体系中加进标记抗原 (约 7,000—9,000 cpm)、抗血清 (工作稀释度 1:7,000), 总体积为 500 μ l。非特异性吸附管用测定缓冲液代替抗血清。然后将反应物 4℃ 孵育 4 小时以上, 使反应充分平衡。孵育后加入 500 μ l 饱和硫酸铵, 使结合 BK

与游离 BK 分离, 放置 15 分钟后再离心 3000 rpm 15 分钟, 将沉淀用国产 FH_2 单频道 γ -能谱仪计数 (图 2)。

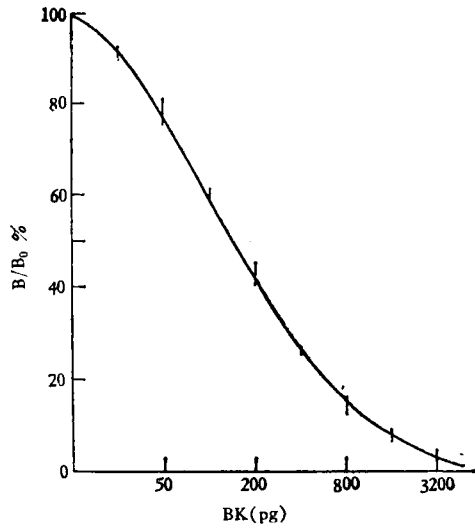


图2 BK-RIA 竞争性抑制曲线

b. 血浆 BK 的测定 血浆经凝胶过滤后, 取出 0.4 ml 作为检品, 以检品代替标准 BK, 其放射免疫测定同标准 BK。用测得检品的 cpm 从标准曲线上查出 BK 含量, 并按照计算公式求出血浆 BK 的含量。公式推导过程:

BK $\mu\text{g/L}$ 血浆

$$= A \times \frac{4}{0.4} \div 84.25\% \div 2 \times 10^3 \times 10^{-6}$$

$$= A \times 5.93 \times 10^{-3}$$

A: 放免测定的 BK (pg) 值。

84.25%: 样品经柱层析后的平均回收率

二、结果与讨论

1. 血 BK 的分离

BK 的抗原决定簇位于羧基末端, 故抗体可与 BK 前体产生交叉免疫。测定 BK 前首先应除去血浆中的激肽元。利用 Sephadex G.25 的分子筛可将分子量大于 5,000 的血浆成份与小分子九肽分开。我们用细胞色素 c 作为大分子标志, 证明其排空体积为 4.0 ml, 大分子成份中包括两种激肽元 (M. W. 120,000 及 80,000), 在随后流出的 4 ml 液体中含 BK 成分, 液体无色透明。

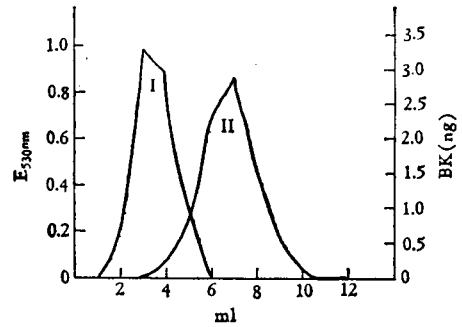


图3 血浆通过 Sephadex G. 25 柱层析分离 BK

图 3 为血 BK 分离层析图, 横向座标为流出液体的体积 (毫升), 峰 I 为大分子成分, 峰 II 为 BK。图中前 2 ml 为血浆样品体积, 第 3—6 ml 为排空体积 (含大分子), 7—10 ml 含 BK。

2. 分离 BK 回收率测定

BK 回收率的测定是将已知量未标记 BK 溶于 1 ml 已知 BK 浓度血浆中, 补加 1 ml 测定缓冲液后上柱, 经 G-25 层析, 收集第 7—10 ml 洗脱液测定 BK 量, 回收率结果见表 1。

表 1 BK 回收率

	加入 BK 量 (ng)	测得 BK 量 (ng)	回收率 (%)
	4.44	3.55	79.95
	13.6	11.86	87.2
	5.7	4.88	85.61
平均			84.25

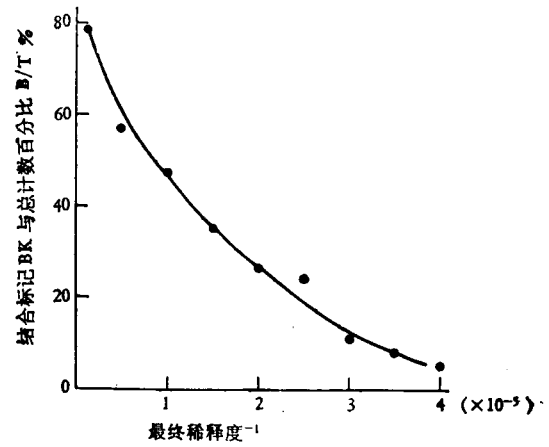


图4 BK 抗血清的 RIA 稀释度曲线

3. RIA 抗血清的稀释度

图 4 是用 7,000—9,000 cpm 标记抗原作为

与抗血清的工作配比,做 BK 抗血清的稀释度曲线,抗血清最终稀释度 1:70,000 时结合百分率为 55% (抗血清 -20℃ 稀释储存后,效价逐渐下降,结合率为 30—40%) 为最适宜。选择这一工作配比做 BK 放免测定得到典型的竞争性抑制曲线(图 2),25 pg 与 0 pg BK 管的结合百分率有明显差别,BK 含量的增加与结合百分率成负相关。

^{125}I -BK 的非特异性吸附是 $6.547 \pm 0.271\%$, 偏离系数 C. V 为 4.1%。批内测定取三个血样,每个血样取 5 管同时测定,偏离系数 C. V 8.0—9.98%,批间是取三个血样分批测定(见表 2)。

通过上述方法测得正常个体血浆 BK 浓度范围为 2.4—7.2 $\mu\text{g/L}$ 血浆 ($n = 23$) ($\bar{X} \pm SD = 4.20 \pm 1.35 \mu\text{g/L}$)。

表 2 血 BK 批内批间测定

血浆样品		BK 均值 $\mu\text{g/L}$	S. D	C. V%
批内	1	3.80	0.30	8.04
	2	3.00	0.24	8.00
	3	2.41	0.24	9.98
批间	1	3.48	0.28	8.28
	2	6.06	0.52	8.61
	3	3.70	0.27	7.21

三、讨 论

血浆激肽系受血浆中几种酶的调节,前激肽释放酶是一种蛋白酶元,它可受第 XII 凝血

因子(哈格曼因子)活化,作用于血浆中的激肽元,释放出 BK。这一系统还受激肽释放酶抑制剂及分解激肽的激肽酶的调节。因此,测定血中 BK 首先要抑制这些酶类,防止由于 BK 的生成或破坏而人为造成 BK 水平过高或过低。在血浆 BK 的制备过程中我们用聚凝胺抑制哈格曼因子,又在一切操作过程中避免接触玻璃(因为玻璃表面带负电荷,可激活哈格曼因子)。并利用乙二胺四乙酸二钠抑制激肽酶,兼抗凝。

1969 年 Talama 等首先报道用 RIA 测定血中 BK,其灵敏度达 1—25 $\mu\text{g/L}$ 血浆。但步骤多,工序麻烦,并且混有激肽元,它与 BK 抗体交叉反应,造成 BK 结果偏高。1972 年 Masbford 等报道的方法虽有改进,但因为脂类干扰使游离 BK 与结合 BK 不易分离,增加了 BK-RIA 测定的困难。

我们所用的测定血 BK 水平的方法,简便、快速,经 G.25 柱一步即分离出血 BK,一次可测定 20—30 个样品。其灵敏性及精确性均好,可用于各种研究工作及临床常规测定。

参 考 文 献

- [1] Pritam, S. V. et al.: *Clin. Chem.*, **26** (3), 429, 1980.
- [2] 陆以信等:《第四次中国生化学术会议论文摘要汇编》, 227, 1981.
- [3] Lennart, H.: *Acta Endocrinologica, Suppl.*, **235**, 94, 1980.

[本文于 1983 年 3 月 7 日收到]

(上接第 53 页)

的顺序是一致的。这种影响可以减少子链合成时碱基出现的不确定性。减少错误的发生。构象适应能和 DNA 聚合酶中的 3'→5' 核酸酶的存在可能是造成这种现象的基础。

参 考 文 献

- [1] Richard, M. et al: *Cell*, **21**:647, 1980.
- [2] David, A. et al: *Cell*, **18**:865, 1979.
- [3] Ross, C. et al: *Cell*, **18**:1285, 1979.

[本文于 1983 年 3 月 7 日收到]