

组织中 cAMP, cGMP 放免分析法的改进

陈海鑫 李振甲

(北京海军总医院免疫室)(北京解放军总医院)

组织的 cAMP、cGMP 常用三氯乙酸等提取方法,操作繁琐,流程长,故影响因素多。为了简化手续和提高准确性,我们对此法和分离剂作了改进。cAMP、cGMP 均为“热稳定因子”,对热有一定的抵抗力,利用这一特性,我们采用沸水变性法。并把北医建立的采用葡萄球菌 A 蛋白(简称 A 蛋白)作分离剂的 ^{125}I 标记的 cGMP 放免测定法^[1],改用聚乙二醇(PEG)为分离剂。现将方法和结果报告如下。

材料和测定方法

1. 三氯乙酸提取:

活组织于液氮中冻结后,或迅速直接称取约 20

mg,加 5%三氯乙酸 1ml,匀浆,离心后取上清用乙醚提取三次,每次 4ml,以除去三氯乙酸。然后取水相于小烧杯中,放 70℃水浴中蒸干,再溶于 0.5ml 缓冲液中,待测定用。

2. 沸水变性:

称取组织约 20mg,加 Tris-HCl 缓冲液或 50mM 醋酸钠缓冲液 0.5ml,匀浆,在沸水中加热 3 分钟,冷却后离心(3000rpm)10 分钟,取上清液便可测定。

3. cAMP、cGMP 测定操作见文献[1,2]。

测定结果

1. 用 20 只雄性上海种小鼠的肝组织,同时用两种

表 1 小鼠肝脏 cAMP、cGMP 测定值比较

	提取方法	例数	$\bar{X} \pm SE$	
cAMP	三氯乙酸	20	0.96 ± 0.18	pmol/mg
	沸水法	20	1.27 ± 0.22	
cGMP	三氯乙酸	20	35.28 ± 10.39	fmol/mg
	沸水法	20	41.27 ± 16.19	

方法提取,进行对比试验,所测的值见表 1。

沸水法所测值均稍高于三氯乙酸法。

回收试验: (1) cAMP 向 8 份肝组织(各约 20 mg)中加标准 cAMP 320~640 pmol,按沸水法提取,进行回收试验,结果为 85—103%,平均为 96%。

(2) cGMP 取 6 份肝组织(各约 20mg),加标准 cGMP 200~400 fmol 进行回收试验,结果为 88—110%,平均为 96%。

2. 两种分离剂的比较: 原法用 A 蛋白作分离剂,我们改用国产(分子量 6000)的 PEG。首先选用 5 种不同最终浓度的 PEG(6.7、8.4、10.1、11.8、13.5%)进行试验,结果以 10.1% 的浓度最适宜。然后用 10.1% 的 PEG 和 A 蛋白同时各做一条标准曲线,结果二者基本相平行, $r = 0.9810$ 。

小 结

改用沸水变性法所测值与三氯乙酸法基本相同。王振纲等^[3]测得小鼠肝组织 cAMP 和 cGMP 正常值

分别为 $1.06 \pm 0.14 \text{ pmol/mg}$ 和 $41.30 \pm 7.50 \text{ pmol/mg}$, 我们测得的为 $1.27 \pm 0.22 \text{ pmol/mg}$ 和 $41.27 \pm 16.19 \text{ fmol/mg}$ 。从我们的回收试验结果表明,沸水法方法可靠,可节省大量试剂和时间。

我们比较了两种方法测定结果,沸水法测得的 cAMP 比原法高 32%, cGMP 高 17%。可能是由于沸水法提取过程简单,丢失少,而三氯乙酸法提取过程复杂,经三次提取,然后蒸干,丢失较多。

^{125}I cGMP 测定,原法用 A 蛋白作分离剂,我们改用国产的 PEG 代替 A 蛋白,价低,操作简便,试剂稳定、分离快速,非特异结合较 A 蛋白低。

参 考 文 献

- [1] 贺师鹏等:《生物化学与生物物理进展》,6,60,1983。
- [2] 李振甲等:《放射免疫分析法手册》,p. 379,科学技术文献出版社,1980。
- [3] 王世真主编:《竞争放射分析》,p. 236,原子能出版社,1981。

[本文于 1986 年 1 月 20 日收到]