

大白鼠血浆皮质酮的竞争性 蛋白质结合分析法*

缪明 刘惠慈 高爱莉 徐斌

(苏州医学院生理教研组)

血浆皮质酮的测定方法很多,西尔佰(Silber, 1954)报道的比色法,任克尔(Zenker, 1958)报道的荧光法,彼得森(Peterson, 1963)报道的双同位素衍生物法,沃尔菲利(Murphy, 1967)、纽瑟姆(Newsome, 1972)和卡梅伦(Cameron, 1973)分别报道的竞争性蛋白质结合分析法以及戈梅斯-桑切斯(Gomez-Sanchez, 1975)报道的放射免疫法等。其中以后二者的灵敏度和特异性为

高,而竞争性蛋白结合分析法较为简便和经济,不需要制备特殊的抗原和抗血清,灵敏度和特异性也与放射免疫法相当。

关于肾上腺皮质激素的研究,国内已介绍了用竞争性蛋白结合分析法测定血浆及尿中的

* 在建立本方法的过程中受到上海第二军医大学病理教研组和中国科学院动物研究所内分泌室的大力支持和帮助,谨致谢意。

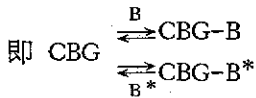
皮质醇,但用此法测定皮质酮未见报道。鉴于针麻原理研究的需要,我们建立了“大白鼠血浆皮质酮的竞争性蛋白结合分析方法”,因常用的啮齿类(鼠、兔)实验动物的糖类皮质激素,主要是皮质酮。

Cameron 氏等报道过¹⁾大白鼠血浆皮质酮的竞争性蛋白结合分析法¹⁾,但不够详细。我们在工作中摸索了操作过程的具体细节,在灵敏度、精密度和准确性以及回收率等方面均有所改进。

一、基本原理

血浆中有一种 α -球蛋白,称为皮质类固醇结合球蛋白(简称 CBG)。它对皮质类固醇亲和力很强,特异性也较高。因此,可以作为特异性结合试剂用于测定皮质类固醇。

本方法是利用大白鼠血浆中的 CBG 作为皮质酮的特异性结合蛋白,以放射性同位素氚(³H) 标记的皮质酮作为指示剂的超微量分析法,又称皮质酮竞争性蛋白结合分析法。在测定过程中,被测皮质酮(B)和一定量的标记皮质酮(B*)互相竞争结合有限量的 CBG。



当皮质酮(B)含量愈多,则标记皮质酮(B*)与 CBG 的结合百分率就愈少,因此结合部分的放射性就愈低。以皮质酮标准量(毫微克 ng)作为横坐标,以 CBG 与标记皮质酮的结合百分率为纵坐标绘出标准曲线。

根据被测血样品放射性结合百分率的高低,可以从横坐标上读出血样品中皮质酮的含量,再按公式即可计算出每 100 毫升血浆中皮质酮的微克数。

二、试剂

(一) 无水乙醇、二甲苯、醋酸乙酯,均为分析纯。

(二) 0.04M 磷酸缓冲液(pH7.4),用重蒸馏水配制。

(三) 2%叠氮钠 用重蒸馏水配制。

(四) 硅镁吸附剂(Florisil) 上海试剂二厂出品。

(五) 闪烁液

1. 对-联三苯(简称 TP) E. Merck 进口分装(上海化学试剂采购供应站试剂厂)。

2. 1.4-双[5-苯基噁唑基-2]-苯(简称 POPOP) 上海试剂一厂。

3. 配方 二甲苯(分析纯) 800 毫升。

醋酸乙酯(分析纯) 200 毫升。

TP (闪烁纯) 3.0 克。

POPOP (闪烁纯) 0.3 克。

(六) 皮质酮 德国 Carl Roth Karlsruhe 出品,用无水乙醇配成 200 微克/毫升,作为储存液存放于 4°C 冰箱。

(七) (6,7-³H₂)-氚标记皮质酮

由上海原子核所供给,主要指标:

放射性比度 27 居里/克分子;

放射性浓度 1 毫居里/毫升。

放化纯度 95%。

工作液用无水乙醇稀释成 2 微居里/毫升。

(八) 0.3% 鼠血清-氚标记皮质酮溶液

1. 结合蛋白(CBG)的制备

20 只成年大白鼠(雌性,体重 250 克)每天服乙稀雌酚 10 微克/100 克体重,连服 7 天,取血前 12 小时手术摘除双侧肾上腺以除去内源性皮质酮。

断头取血,肝素抗凝,分离血浆,然后分装(每瓶装血清 1 毫升)在 -20°C 低温冰箱保存。临用时取出每瓶用磷酸缓冲液稀释至 10 毫升。离心 5 分钟使絮状凝块沉淀,待用。

2. 0.3% 鼠血清-氚标记皮质酮溶液的配制方法如下:

0.04M 磷酸缓冲液(pH7.4) 285.0 毫升

2% 叠氮钠 3.0 毫升

³H-皮质酮工作液(2 微居里/毫升) 3.0 毫升

1) Cameron, E. H. D. and J. J. Scarsbrick, 1973 J. Steroid Biochemistry 4: 577-584.

大白鼠血浆(已稀释 10 倍)吸取上清液 9.0 毫升。混匀后,置 4°C 冰箱保存。

(九) ^3H -皮质酮磷酸缓冲液(临用时配制)

磷酸缓冲液	98.0 毫升
^3H -皮质酮工作液	2.0 毫升。

三、操作步骤

(一) 皮质酮标准管

分别取含 0.25、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、8.0 毫微克皮质酮的标准液置鉴定管内(每种标准量都作 3 管),在 38—40°C 温水中用微弱的净化压缩空气吹干。这 7 种标准量作为 B_1 — B_7 管而以 0 毫微克作为 B_0 管。

(二) 样品管

1. 萃取 吸取 0.1 毫升血浆放入有磨口塞的离心管中,加入 1 毫升醋酸乙酯,盖紧磨口塞,在康氏振荡器上快速振摇(振荡频率 270 次/分),每振摇 5 分钟后静止 5 分钟,共振三次。

2. 离心 10 分钟(4000 转/分),使蛋白质完全下沉管底。

3. 吸取 0.1 毫升上清液放入鉴定管中,在 38—40°C 水中用微弱的净化压缩空气吹干。

(三) 竞争结合反应

1. 加 1 毫升 0.3% 鼠血清—氚标记皮质酮溶液于标准及样品管中。

2. 于 38—40°C 水浴中放置 10 分钟,再放康氏振荡器上振摇 1 分钟,使之混匀。

3. 在 4°C 冰箱内放置 30 分钟进行竞争结合反应。

(四) 分离游离与结合的皮质酮

1. 将整套鉴定管放置 4°C 冰水槽内,用玻璃匙加入 70 毫克硅镁,置康氏振荡器振摇 2 分钟。立即移至冰水槽内静置 10 分钟,使吸附了游离型皮质酮的硅镁颗粒完全下沉。

2. 吸取各鉴定管中的上清液 0.5 毫升放入含有 6 毫升闪烁液的测量瓶内¹⁾盖紧瓶塞后,振摇 1 分钟。

3. 吸取 0.5 毫升 0.3% 鼠血清—氚标记皮质酮溶液直接放入含有 6 毫升闪烁液的测量瓶内,盖紧瓶塞后,振摇 1 分钟(重复双管)作为 T 管

(即总放射性的管子)。

4. 静置 30 分钟后进行液体闪烁计数。

(五) 测量条件

FJ—353 型双道液体闪烁谱仪;测量瓶为华北制药厂链霉素瓶加磨口塞。

(六) 计算方法

以 $B/B_0 \times 100\%$ 绘制标准曲线,根据标准曲线可以查出样品管的皮质酮的毫微克数(x),然后计算 100 毫升血浆中皮质酮的微克数,公式如下:

$$x \text{ 毫微克} \times 10 \times \frac{100}{0.1} \times \frac{1}{1000} = 10x \text{ 微克} / 100 \text{ 毫升}。$$

其中,10 代表萃取液的 1/10 用量;100/0.1 代表血浆用量为 0.1 毫升相当于 100 毫升血浆的比例。1/1000 代表毫微克与微克之间的比例。

四、结果

(一) 标准曲线与灵敏度

用 0.3% 鼠血清—氚标记皮质酮溶液在不同天制成的 12 条标准曲线各点的重复性较好,平均变异系数为 4.11% (图 1)。

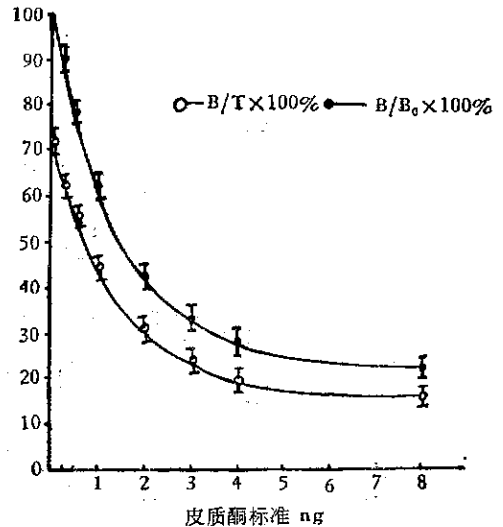


图 1 测定皮质酮的标准曲线

1) 中国医学科学院首都医院内分泌组: 1976 《放射免疫分析及其它放射体外测量方法》 186—203 页, 原子能出版社。

根据标准曲线,在0—1.0毫微克之间和1.0—2.0毫微克之间,其平均灵敏度分别为0.1和0.2毫微克。

(二) 回收

1. ^3H -皮质酮的水及血回收 6次测定的结果分别为 $97.6 \pm 3.7\%$ 和 $95.5 \pm 4.0\%$ 。

2. 非标记皮质酮的血回收

为检验这一方法的回收率、精密度和准确性,取一批切除双侧肾上腺后12—16小时的大白鼠血浆(14只大白鼠的混合血浆)分为四

组:

第一组为对照组,不加皮质酮。

第二组加入相当于5微克/100毫升血浆的皮质酮标准。

第三组加入相当于10微克/100毫升血浆的皮质酮标准。

第四组加入相当于20微克/100毫升血浆的皮质酮标准。每组重复测定8次,回收率均在97—103%的范围内,其变异系数均小于10%(表1)。

表1 非标记皮质酮的血回收

血 样	加皮质酮量 微克/毫升	血浆体积 (测定次数)	皮质酮测定值 ($M \pm SD$ 微克/毫升)	变异系数 (C. V.)	回收率(%)
第一组	0	0.10 毫升(8)	0	—	—
第二组	5.0	0.10 毫升(8)	5.16 ± 0.34	6.58	103.2%
第三组	10.0	0.10 毫升(8)	9.70 ± 0.41	4.23	97.0%
第四组	20.0	0.10 毫升(8)	19.81 ± 1.10	5.56	99.1%

注: 血浆体积用0.1毫升,醋酸乙酯加1.0毫升(为血浆体积的10倍)

(三) 精密度

为了进一步检验本法的精密度,对皮质酮含量不同的二种血浆(在同天和不同天)各进行15次重复测定结果,其平均值分别为: 11.5微克/100毫升,标准差 ± 0.82 微克/100毫升、变异系数7.13%; 22.4微克/100毫升,标准差 ± 2.18 微克/100毫升、变异系数9.73%。

(四) 血样品分析

1. 正常雄性成年大白鼠上午8—10时的皮质酮含量为 9.60 ± 2.77 微克/100毫升。(9只大白鼠,皆为心脏取血,从抓动物至取血在5分钟内完成)。

2. 大白鼠14只,双侧肾上腺摘除后12—16小时,其血浆皮质酮含量与空白管一样(测不出来)。

3. 大白鼠23只,垂体摘除后7—14天,其血浆皮质酮含量也与空白管一样。

五、讨 论

(一) 关于特异性 Cameron 氏等的“大白鼠血浆皮质酮的竞争性蛋白结合分析法”,以及 Gomez Sanchez 氏¹⁾等的“大白鼠血浆皮质酮的放

射免疫分析法”都证明,在正常大白鼠中,其它激素的交叉干扰不可忽略不计,因此不需要经过一个复杂的纯化步骤。

(二) 关于标准曲线的斜率 根据加入标准皮质酮 B/T 下降的百分率看来,本法优于 Cameron 氏等的方法(表2)。

表2 加入标准皮质酮后, B/T 下降的百分率

标准曲线范围	在0—1.0毫微克	在1.0—2.0毫微克
Cameron 氏法	由45%下降到28% 相差17%	由28%下降到23% 相差5%
本 法	由70.25% 下降到42.50% 相差27.75%	由42.50% 下降到29.20% 相差13.3%

(三) 最适血浆浓度(即最适 CBG 浓度)的选择 一般说 CBG 浓度愈大,灵敏度愈差,但是 CBG 浓度过低会使测定的范围过于狭小,不能适合样品中皮质酮的变化,因此选择一个适当的血浆浓度是十分重要的。

用 ^3H -皮质酮磷酸缓冲液0.5毫升加0.5毫升各种浓度的血浆使之混合成6种血浆浓度

1) Gomez-Sanchez, C. et al. 1975 *Endocrinology* 96 (3) 796—798.

(每种重复 6 管)。选择 0.3% 的血浆浓度较好 (图 2), 在经常遇到的样品皮质酮浓度范围内 (0.25—2.00 之间), 灵敏度和标准曲线的有用范围均能满足实际需要。

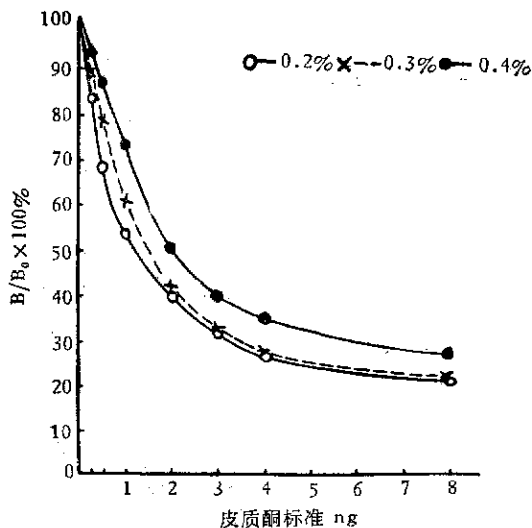


图 2 血浆浓度与标准曲线各点的关系

(四) 关于硅镁吸附剂的处理 上海试剂

二厂产的硅镁, 颗粒大小相差悬殊, 吸附率很不恒定, 因此须进行碾磨, 过筛, 用 70—100 目粒子。但一些太细的粉尘样颗粒不易除净, 在溶液中不能自行下沉, 在没有冰冻离心机的条件下, 可以用双蒸馏水飘洗掉粉尘样颗粒, 再用无水乙醇洗涤、凉干、烘干, 使吸附率恒定。

(五) 关于回收率问题 试用过二氯甲烷、甲醇和醋酸乙酯三种溶剂萃取, 证明醋酸乙酯萃取效果较好, 当加入 10 倍于血浆量的醋酸乙酯在康氏振荡器上振摇 5 分钟时, 回收率在 80—90% 之间, 后来改用振摇三次, 共 15 分钟萃取, 可使回收率基本恒定, 接近 100%。

(六) 值得注意的问题

1. 操作过程中, 除称量的准确外, 还要严格控制温度和时间。
2. 必须使所测样品中的皮质酮含量落在标准曲线灵敏度较高的区间, 如样品中含量偏高, 可以用 20 倍于血浆的醋酸乙酯萃取。即血浆取 0.1 毫升, 醋酸乙酯用 2 毫升