DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.02.019

小肠组织中降钙素基因相关肽的放射免疫测定

吴 康 蔡文琴 (第三军医大学基础部组织胚胎学教研室) 630038

降钙素基因相关肽(Calcitonin gene-related peptide,CGRP)是近年来应用现代分子生物学技术新发现的生物活性肽[1]。大量资料表明,CGRP广泛分布于中枢及周围神经系统,并参与机体感觉、血流及胃肠分泌等多种生理机能的调节。目前,关于CGRP的定量研究资料较少,国内尚无简便易行的定量测定方法。从国外订购放免药盒,价格昂贵,手续烦锁,周期较长。本文应用国产同位素,进口CGRP抗体及抗原,建立了较优级的放免测定(Radioimmunoassay,RIA)方法,并成功地应用于大鼠小肠组织中CGRP的定量测定。

1 材料与方法

1.1 试剂

实验所用主要试剂详见表1。

表1 RIA主要试剂一览表

试 剂	来源	生产单位	工作浓度
[Try°]-CGRP	大鼠	Peninsula Lab. Inc.	
抗CGRP血清(RIA)	兔	Peninsula Lab. Inc	9pM/管
羊抗兔血清(GAR)	羊	上一医红旗制药厂	1:2
正常兔血清(NRS)	兔	自 制	1:8

1.2 标本制备

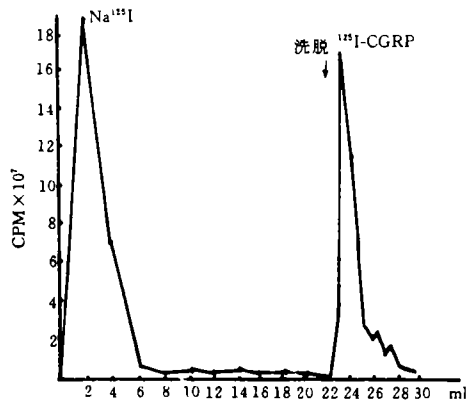
动物经断头处死,取小肠以生理盐水冲去肠内容物后,迅速投入沸腾的生理盐水煮8~10 min,吸水纸吸去表面水分后,剥去明显的系膜脂肪组织,称重(分段组中取头、尾及中段各0.5 g组织,以保证取材部位的准确性),于小烧杯中剪碎,加入0.5 mol/L醋酸-0.1 mol/L PB(8 ml/g组织),4℃过夜,次晨于冰盒中用ZX-83-1型内切式匀浆器匀浆(10 000×g×1 min),继续置4℃提取6 h,然后,4℃离心(4 500×g×30 min),取上清液2 ml,以新配的1 N NaOH调至中性,并加PBS至4 ml,分装后于-20℃以下保存备用。另取大鼠5只,取小肠剪成数节,煮沸前后称重,求得煮后小肠重量丢失系数,以换算小肠每克湿组织(g·w·t)CGRP含量。

RIA样品回收组:每克空肠组织中加入40 ng CGRP标准品,提取、匀浆、离心等处理同前。

标准品回收组:将装有新配的CGRP标准品的试管于沸水中煮沸10 min,与未煮标准品同时测定[2]。

1.3 ^{125}I-CGRP的制备

以氯胺-T法[3](改良)标记CGRP,主要步骤如下:取[Tyr°]-CGRP(Peninsula Lab. Inc.)2.5 μg,溶于25 μl 0.5 mol/L、pH7.4的PB中,加入Na-^{125}I 400~500 μCi,然后,加入氯胺-T 20 μl(0.02%)反应60 s,以0.02% $Na_2S_2O_5$ 40 μl终止反应,加入少量HCl及正常兔血清,用Sep-Pak C18柱(waters Associates)分离、纯化、收集洗脱液,以FJ-2003.50型r-计数仪计数、收集峰见附图。



附图 ^{125}I标记CGRP-Sep-Pak C18柱分离图

1.4 测定方法及加样程序

采用平衡加样程序(表1)[4],二抗分离。主要步骤:加样→4℃×48 h→GAR(室温×30 min)→正常兔血清(NRS)(室温×2 h)→PB(室温×30 min)→离心(3 000×g×20 min,4℃)→沉淀物计数。

1.5 数据处理

采用苑锡光编著(医用统计分析)程序包中的"MRA-1"程序,各浓度以标准品管特异性结合比:(B/B_0×100%对[CGRP](pg/50 μl)进行拟合,求出最佳方程,作为理论标准曲线,对[CGRP]进行预测。用"PDA-2"程序进行单因素方差分析,并对各组均值进行显著性检验[5]。

2 结果

2.1 RIA主要方法与指标

Na-^{125}I利用率:72.74%

标记率:58.8%

^{125}I-CGRP比放射活性:145 μCi/μg

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

样品收取率:92.87±10.13(%)

标准品回收率:101.18±5.41(%)

特异性结合率:33.4(%)

亲合常数:$2.5113\times10^{12}\ M^{-1}/L$

"效点评分":30分

2.2 正常大鼠小肠CGRP含量

CGRP在正常大鼠各段小肠的含量详见表3。

表3 正常大鼠各段小肠CGRP含量(hg/g·w·t)($\bar{x}\pm s$)

全段小肠	十二指肠	空肠	回肠
59.996±13.583	57.981±12.548	71.568±25.635	74.24±21.554

3 讨论

有关CGRP的RIA资料较少,Okimura等用RIA测定了大鼠十二指肠CGRP,含量为26.6±2.7 ng/g·w·t[6],显著低于本文所得结果,可能与标本处理有关。本文采用国产同位素(Na-^{125}I)、进口CGRP标准品及其放免抗血清等主要试剂,用氯胺-T法自制标记抗原(^{125}I-CGRP)、Sep-Pak C18纯化标记物、平衡加样程序加样等建立了较优级的CGRP-放免分析方法(效点评分30分>28分)[4]。主要体会如下:

3.1 标本的制备

RIA为敏感性很高的定量测定方法之一。在肽类物质的测定中,断头处死动物后,以煮后称重的顺序取材为好;这样可使组织内的肽酶迅速得以灭活,且可不用抑肽酶等制剂(血液标本例外);以后的操作应尽量在4℃或低温条件下完成。

3.2 抗原标记方面

标记用同位素应具有高的放化纯度,同位素应尽量新鲜(即购进后尽早使用),否则放化纯度下降,不易制得高比活性的标记物;采用Sep-Pak C18柱分离、纯化标记物,方法简单、省时,只要用后清洗完全,可反复使用数次;标记物一经鉴定(结合试验)合格后,宜立即分装和尽早使用。

3.3 测定

在血清有限的情况下,采用非平衡加样程序加样不能达到满意的结合率时,可试用平衡加样程序加样[4]。

3.4 RIA结果的处理

一般RIA结果的处理,常用人工绘制标准曲线、人工根据曲线查值后再进行统计计算的方法。本文根据各浓度标准品管的特异结合比(B/B×100%),先在平面坐标线上绘制散点图,发现其近似指数曲线分布,故用包括指数关系式的五种曲线关系进行拟合,选出最佳回归方程,作为理论标准曲线,根据结合比来预测相应的物质含量,最后进行统计检验。由于标准曲线的公式比,既可避免由于人工绘制曲线和人工查值带来的双重误差,提高精度;又便于计算工具(计算机、计算器等)进行机器运算,从而减轻了工作强度。但需要强调的是:在进行拟合时,应以纵坐标去拟合横坐标,也即被预测项应为物质含量,因为,相互关系的拟合方程,是根据残差最小而选出的,若将因变量与自变量关系变换后,对物质含量进行预测,其残差不一定是最小。

关键词 降钙素基因相关肽;放射免疫测定

中图法分类号 Q516;R446.62

参考文献

1 Morris HR, Panico M, Etienne Tony, et al. Isolation and characterization of human CGRP. Nature, 1984, 308: 746~748

2 Mulderry PK, Ghatei MA, Rodrigo J, et al. Calcitonin gene-related peptide in cardiovascular tissues of the rat. Neurosci, 1985, 14: 947~954

3 Greenwood FC, Hunter WN. The preparation of ^{131}I-labbled human grwoth hormone of high specific radioactivity. Biochem J, 1963, 89: 114

4 尹伯元. 放射免疫测定基础. 天津:天津科学技术出版社. 1985

5 苑锡光. 医用统计分析. 成都:四川科技出版社. 1985

6 Okimura Y, Chiharak, Abe H, et al. Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the central mervous system and peripheral organs of rats. Regu Peptides, 1987, 17: 327

(收稿:1993-04-01;修回:1994-02-14)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net