DOI:10.16016/j.1000-5404.1987.03.015

技术与方法

血管活性肠肽的放射免疫测定及其初步应用

王正品 蔡文琴（组胚教研室）

自1970年Said和Mutt从猪肺和小肠组织中提纯血管活性肠肽（Vasoactive Intestinal Polypeptide, VIP）以来[1]，发现VIP在体内，尤其在中枢神经系统和胃肠道，既存在神经细胞中，也存在于内分泌细胞。因此，被认为是神经递质和激素，与许多生理功能相关，特别是扩血管效应[2]。关于VIP的放射免疫测定（RIA），国内外已有报告[3][4]。本室在研究胃肠道神经肽的工作中，建立了一种简便，可靠，便于推广的VIP的RIA方法，并将此法用于观察肠型放射病大鼠小肠内VIP的动态变化，已有初步结果。本文将方法和结果介绍如下。

方法和结果

一、VIP标准品

VIP系Sigma Chemical Company产品，用双蒸水溶解，分装并冷冻干燥，贮存于－40℃冰箱中备用。

二、^{125}I标记VIP及纯化法

1. 标记方法：按氯胺T标记法[5]制备标记VIP：5μgVIP溶于50μl 0.05M pH7.5磷酸缓冲液中，加入Na^{125}I（北京）800μCi，再加入氯胺T 10μl（2mg/ml），振匀，反应60秒钟，加入偏重亚硫酸钠20μl（2mg/ml），混匀以终止反应。

2. 纯化法：用Waters公司生产的Sep-Pak C_{18}柱纯化。预先用100%乙腈（上海）30ml冲洗柱，再用双蒸水120ml冲洗，备用。将上述标记反应液加入柱内。20ml双蒸水洗脱游离碘及其他杂质，并再用酸乙腈（75%乙腈-1%乙酸、双蒸水）6ml洗脱，分别收集，共20管，依次在γ-计数器上计数，结果见图1。^{125}I-VIP的比放射性用公式计算[6]。为138μCi/μg。

3. 结合试验：用VIP抗血清1/2000浓度，分别与酸乙腈洗脱的第二、三、四管^{125}I-VIP做结合试验。结果洗脱第二管^{125}I-VIP质量最高。加样同表1的O标准管。

4. ^{125}I-VIP贮存：分装第二管，于-40℃下贮存45～60天。

5. 分离B与F：本实验用二抗（羊抗兔血清，1/10）100μl＋3.3%PEG400μl/管，离心30分钟，分离B与F，效果好（特异结合高，非特异结合低）。

三、VIP抗血清

1. 抗血清来源：购于美国Immuno Nuclear Corporation。

2. 抗血清工作浓度选择：用倍比稀释法将VIP抗血清稀释成不同浓度，再与^{125}I-VIP结合，按公式计算结合百分率。结果见图2，表明在RIA中最大结合率为85.3%，最低浓度结合率＜5%。工作浓度选（B/T＝40～50%）1:32000的VIP抗血清浓度。

$$B/T\ (\%) = \left[\frac{\text{VIP抗体} + {}^{125}\text{I-VIP cpm}}{\text{投入}{}^{125}\text{I-VIP cpm}} - \text{NSB}\right] \times 100\%$$

3. 抗血清亲和常数：按Scatchard做图法，算得VIP抗血清亲和常数（K值）为4.5×10^{9} L/M。

四、标准竞争抑制曲线

1. PELH缓冲液：0.1M pH7.5 PB液，内含0.11%EDTA-2Na，0.1%溶菌酶及0.002%洗必泰。供稀释标准品、抗血清、标记VIP及样品用。

2. VIP-RIA程序：将VIP标准品稀释成0.1至10000pg/50μl，^{125}I-VIP为9000～11000cpm/50μl，抗血清1:6500（初浓度），按表1加样。

反应在塑料试管中进行，均作复管。加样后充分混匀。孵育用非平衡法。72h后用二抗＋PEG分离B与F，测定B。得cpm按公式计算：

$$B/B_0\ (\%) = \frac{B - Co}{B_0 - Co} \times 100\%$$

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

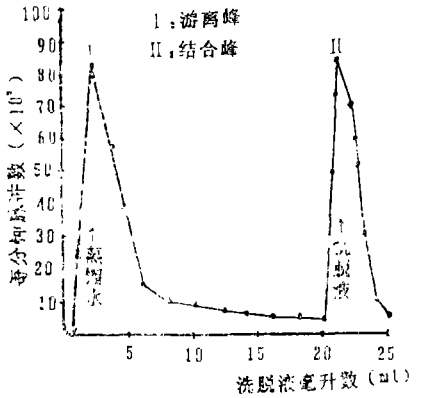


图1　^{125}I标记VIP-Sep-Pak柱分离图

表1　VIP-RIA加样顺序（总体积0.5ml）

	空白对照管 (Co)	0标准管 (Bo)	标准品管 (B)	样品管* (Sx)	总计数管 (T)
VIP抗血清	—	100μl	100μl	100μl	—
VIP标准品	—	—	50μl	—	—
样品	—	—	—	100μl	—
缓冲液	450μl	350μl	300μl	250μl	—
4℃，孵育24h					
^{125}-VIP	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
4℃，孵育48h					

* 样品管中组织匀浆5μl＋95μl缓冲液，共计100μl

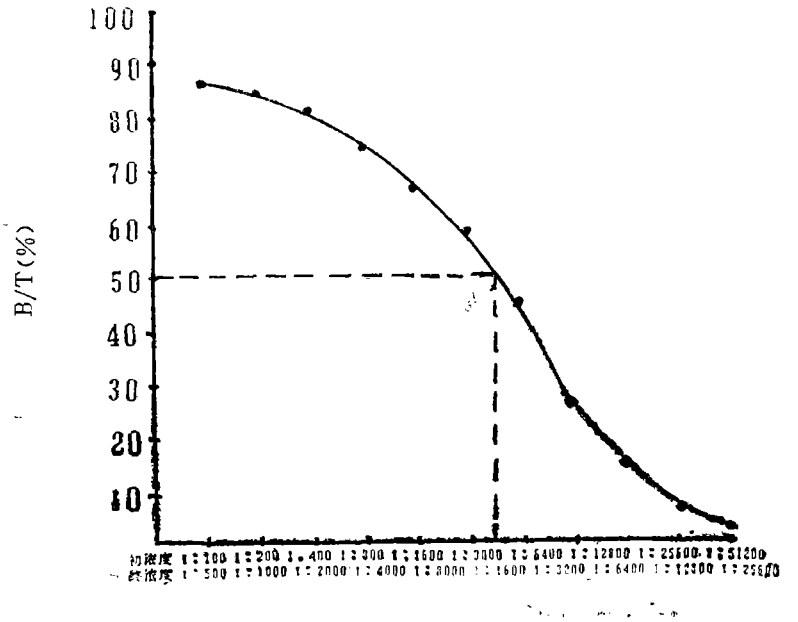


图2　VIP抗血清稀释曲线

3．绘制标准曲线：

以B/B_0的百分结合率为纵座标，VIP浓度的对数为横座标制图3。样品管的结合率计算同上，可由标准曲线求出相应的VIP测定值。

五、肠型放射病大鼠小肠组织中VIP的RIA

1．动物：选24只S.D（Sprague-Dawley）纯系雄性大鼠。分四组，每组6只。一组为正常对照组，另三组为实验组。实验组用^{60}Coγ-射线2000 rad一次性全身照射（184.2伦/分），造成典型放射性肠病，分照后24h、48h和72h三组取材。

2．样品制备：取大鼠速断头，剖腹取十二指肠及空肠，于沸生理盐水中煮五分钟，加1 N乙酸匀浆、提取、离心取上清，加1 N NaOH中和，使提取液pH至7.6。于－40℃下贮存。

3．样品测定：按表1加样程序进行，结果见表2。

4．回收率：取VIP标准品10、100、1000ng，分别设置三种剂量回收管，测定值按下公式计算回

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

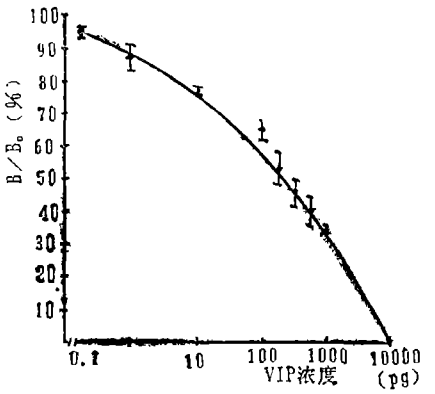


图3 VIP标准曲线

表2 肠型放射病大鼠小肠内VIP的RIA值（ng/g湿组织）

正常对照组	放射病组		
	24h	48h	72h
150.8 ±10.36	158.3 ±10.77	257.5 ±24.96	235 ±26.66

N=24, M±SEM

收率：

回收率=

$$\frac{\text{回收管测定值}-\text{对照样品管测定值}}{\text{回收管中加入的已知VIP量}}\times 100\%$$

本实验回收率为：70.1～74.4%。

六、方法评价

按“效点系统”（Power-Point System）评分[7]，VIP的RIA可得34分，可评为优良级的RIA法（表3）。

表3 VIP-RIA方法评分（效点系统）

	项目	结果	评分
标准曲线	“O”标准结合率：$\frac{\text{Bo cpm}}{\text{T cpm}}\times 100\%$	40.1%	3
	置换率：“O”标准的百分结合率 / 最高标准的百分结合率	8.02	8
	最小检出量：取代“O”标准管结合的2.5%最低抗原浓度	6pg	5
	百分精密度：$\frac{\Sigma 1\text{标准}-\text{均值}1}{\Sigma\text{标准}}\times 100\%$	2.01%	9
肠提取液测定正确性	$\frac{\Sigma(\text{测定值}-\text{真值})}{\Sigma\text{真值}}\times 100\%$	3.35%	9
合计			34

讨论

抗血清质量是RIA成败的关键之一。鉴定抗血清质量有三方面的标准，首先是抗血清的特异性，以交叉反应百分率表示，要求交叉反应＜5%。二是抗血清的滴定度，以结合百分比（B/T）在50%的滴定度为准。再是抗体的亲和常数（K值），要求抗体K值不少于1×10^8L/M。本次VIP的RIA所用抗血清无交叉反应，滴定度B/T=50%时为1/32000，K值为4.5×10^9L/M。证明抗血清质量好。

RIA成败的关键之二是高质量的标记抗原。而制备高质量的标记抗原必须具备三方面的条件：（1）优质抗原标准品，即高免疫原性和高化学纯度；（2）良好的标记方法；（3）标记抗原的纯化技术好。才能使标记抗原具有比放射性高，免疫原性不变的质量。本实验所用VIP标准品质量高：购于Sigma公司，化学纯度达99%（说明书），保存条件好。

VIP为多肽，分子量3326，第10、22位为酪氨酸残基[8]，为选择放射性碘标记提供了先决条件。对VIP的碘标记法文献介绍了两种[3]，一种为氯胺T氧化法，二为乳过氧化物酶法。本实验选用氯胺T氧化法，其原理是以氯胺T在溶液中产生次氯酸，起氧化剂的作用，使阴离子碘氧化成带阳电荷的碘分子，然后取代抗原分子中酪氨酸环3、5位上的氢[5]。氯胺T的用量和反应时间直接影响标记效果，只有摸索出适当的剂量及反应时间才能制备出标记率高，损伤小的标记抗

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

原。本实验氯胺T用量为20μg，反应时间为60秒钟。

本实验试用Sep-Pak C_{18}柱作^{125}I-VIP纯化，效果较好，迄今未见文献报告。Sep-Pak C_{18}柱分离纯化碘标混合物的基本原理是：当加^{125}I-VIP与游离碘混合物时，极性大的^{125}I-VIP吸附在柱内，极性小的^{125}I及杂质被双蒸水洗出。再用极性程度低的酸乙腈洗脱^{125}I-VIP。Sep-Pak C_{18}柱所用柱床与高压液相层析系统柱床填料相同。Marie等（1985）将^{125}I-VIP经高压液相层析，酸乙腈洗脱，分离出未标上的VIP及单标^{125}I-VIP[9]。根据这一结果，作者采用酸乙腈洗脱^{125}I-VIP，并小体积分散收集洗脱液，将各管洗脱^{125}I-VIP分别与VIP抗血清做结合实验。结果表明洗脱第二管特异性结合高，NSB低，且保存时间长。故作者认为Sep-Pak C_{18}柱用于纯化^{125}I-VIP是一快速、简便而可靠的方法。

RIA建立的另一基本条件是良好的分离B与F的方法。本实验采用二抗加PEG、活性炭等三种分离方法，结果与Said（1982）的结论基本一致[10]。认为二抗加3.3% PEG分离效果最佳，特异性结合高，NSB少。

效点评分法是Cerceo（1974）[7]提出的一个用评分来衡量RIA质量的标准，称为效点系统。尽管该法存在较大的局限性，但仍不失为一种客观综合性的量的评价方法，故至今仍广泛采用。本文方法考核达34分（>28分），属于优良级水平。并初步用于肠型放射病大鼠小肠内VIP的测定，发现辐射损伤后48h至72h大鼠小肠内VIP的含量较正常组显著增高（$P<0.05$），而伤后24h无明显变化。对于辐射损伤后大鼠小肠内VIP的变化情况，至今还未见有文献报告。

参 考 文 献

1. Said SL and Mutt V. Science NY 1970; 169:1217
2. Said SL. Vasoactive intestinal peptide. edited by SI Said. Raven Press. NY, 1982; 145～299
3. Chang TM, et al. Analytical Biochemistry 1979; 97:286
4. 陈元方等，中华核医学杂志 1986; 6(1):18
5. Greenwood FC and Hunter WM. Biochem J 1963; 89:114
6. 肖祥熊，等。实用放射免疫分析及其临床意义。同济大学出版社，1985:42
7. Cerceo E. Lab Pract 1974; 23:625
8. Bodanszky M and Bodanszky A. Vasoactive intestinal peptide. edited by SI Said. Raven Press. NY, 1982; 11
9. Marie JC, et al. Regul Pept 1985; 12:113
10. Pandian MR, et al. Vasoactive intestinal peptide. edited by SI Said. Raven Press. NY, 1982:35

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