DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.05.011

技术与方法

雌、孕激素胞浆受体测定方法介绍

陶晓靖 何世荣（西南医院 妇产科）

细胞受体含量的测定及对其动力学的研究是一项专门技术。我们系统全面地摸索了活性炭葡聚糖法（DCC法）测定雌激素胞浆受体（ERc）和孕激素胞浆受体（PRc）的基本条件，进一步改进了雌、孕激素胞浆受体的测定方法，现介绍如下。

材料与方法

研究对象

1．人子宫内膜：增生期正常妇女子宫内膜，用小号刮匙刮取50～300mg。2．成年雌性大鼠子宫：雌性大鼠体重250～300g，脱颈椎活杀后，剖腹取子宫。

药物

^{3}H-E_2：放射比度40mCi/nmol，上海原子能研究所提供。^{3}H-R_{5020}放射比度87mCi/nmol，New England Nuclear Company产品。葡聚糖（分子量90 000）上海长征制药厂生产。

实验方法

刮取的子宫内膜或大鼠子宫立即置于冰TEGD缓冲液中〔10mmol Tris，1.5mmol EDTA，2mmol巯基乙醇，5mmol 钼酸钠，10%甘油(V/V)，pH 7.35～7.40〕，洗净血液后剪碎，按1∶5 (V/V)的比例加入TEGD缓冲液，用内切式组织匀浆器7000～10000rpm匀浆三次，每次15s，间歇20s。制备的匀浆液经20000×g离心60min，上清液即为胞浆。以上所有过程都在0～4℃进行，以防受体破坏。

胞浆蛋白含量测定：按Lowry法测定，以牛血清白蛋白为标准。

受体测定

1．ERc测定：100μl不同浓度的^{3}H-E_2(0.1～3 mmol)与200μl一定蛋白浓度的胞浆共同孵育以测定^{3}H-E_2的总结合（T_B），100μl相应浓度^{3}H-E_2及100～200倍浓度的非标记DES（已烯雌酚）和200μl相同蛋白浓度的胞浆共同孵育，以测定非特异性结合（NSB）。T_B减去NSB即为^{3}H-E_2的特异性结合（SB），也即ERc含量。孵育温度为0～4℃，孵育到时后加入300μl 0.5% DCC悬浮液（0.5%活性炭，0.05%葡聚糖，用TEGD缓冲液配制，pH7.35～7.40，用前于冰浴中搅拌2 h），于冰浴中间歇性振摇15min后，于0～4℃ 1000×g离心15min，取全部上清液加入含8 ml甲苯闪烁液（ppo 4 g，popop400mg，二甲苯1000ml）的闪烁瓶中振荡1 min后，次日送测cpm。

2．PRc测定：^{3}H-R_{5020}浓度为0.2～3nmol，非标记孕酮为^{3}H-R_{5020}浓度的400～800倍。其余方法同ERc测定方法。

胞浆受体浓度以每mg胞浆蛋白质中受体的结合位点fmol值表示，即fmol/mg胞浆蛋白。根据饱和曲线及Scacth plot计算，证实所测定的标记激素特异性结合蛋白为具有低容量、高亲和力的特异性受体。人和大鼠子宫ERc、PRc测定的kol值绝大多数在10^{-10}mol水平。

结果与讨论

一、胞浆蛋白浓度对ERc、PRc测定的影响

将胞浆稀释为不同蛋白的浓度后，与标

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

记激素及非标记激素在0～4℃孵育一定时间后观察不同胞浆蛋白浓度对 ^3H-E_2及^3H-R_{5020}特异性结合的影响。结果表明：ERc测定时，胞浆蛋白的浓度在一个较大范围内变化，不影响测定结果，与陈贵安等[1]的结果相同。但在PRc测定时，人子宫内膜及大鼠子宫胞浆蛋白浓度在1～3 mg/ml时，SB随蛋白浓度增加而增加，相关系数r = 0.99，当胞浆蛋白的浓度为4～6 mg/ml时，SB稳定在一定水平，不再随胞浆蛋白浓度变化而变化。见图1。

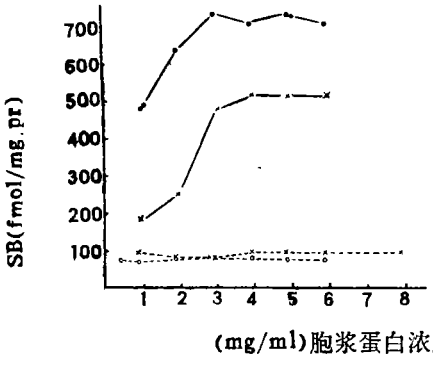


图1 胞浆蛋白浓度对ERc、PRc测定的影响

二、孵育时间对ERc、PRc测定的影响

同一蛋白浓度的胞浆与^3H-E_2或^3H-R_{5020}及非标记激素在0～4℃孵育，观察不同孵育时间对SB测定的影响。人子宫内膜ERc及PRc测定孵育时间分别在2～16h及4～16h不会影响SB的结果，大鼠子宫ERc及PRc测定时孵育2～16h，SB保持相对稳定。见图2。

三、孵育温度对ERc、PRc测定的影响

一定蛋白浓度的胞浆与标记激素及非标记激素在37℃、25℃、及0～4℃孵育相同时间后，观察不同孵育温度下^3H-E_2及^3H-R_{5020}的特异性结合情况。如图3、4所示：ERc测定时以25℃孵育时所测SB最高，但稳定时间较短，0～4℃孵育时SB较高，稳定时间长，37℃孵育时SB最低，且不稳定。

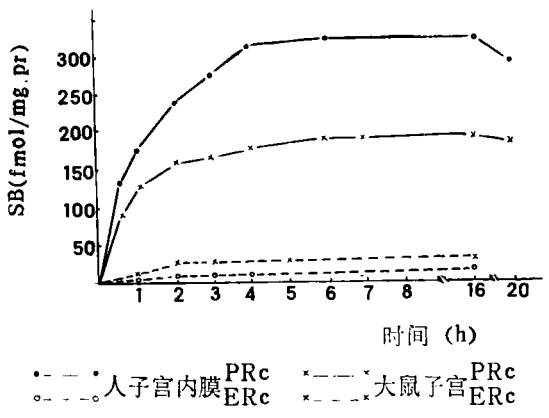


图2 孵育时间对ERc、PRc测定的影响（0～4℃）

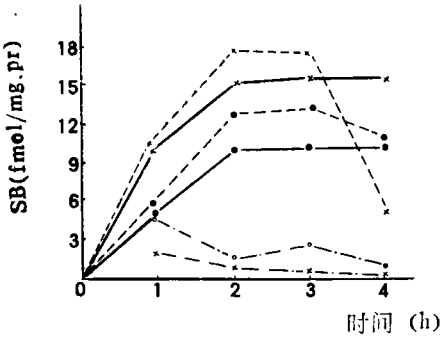


图3 孵育温度对ERc测定的影响

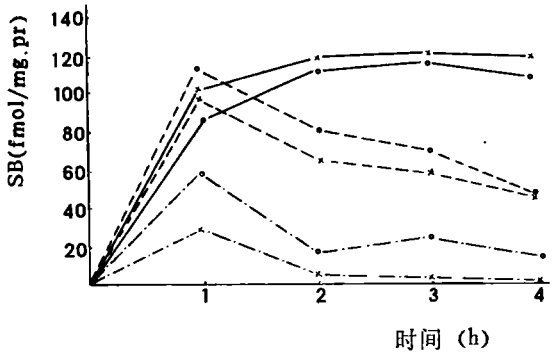


图4 孵育温度对PRc测定的影响

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

PRc测定时则以0～4℃孵育时SB最高，最稳定；25℃和37℃孵育下SB均不稳定，随孵育时间延长，SB迅速降低，与刘以训[2]的观点相符，即受体是一种热不稳定的蛋白质，遇热后受体破坏，孕酮受体尤为娇嫩。

通过对上述条件的摸索，我们认为人子宫内膜ERc、PRc的测定条件与大鼠子宫ERc、PRc测定条件基本相同。在ERc测定时胞浆蛋白浓度在较大范围内不影响测定结果，因此在临床上取材少的情况下，可将胞浆稀释至0.5～2 mg/ml的低蛋白浓度水平，不影响结果，在25℃孵育2～3 h可测得高水平的SB，而且节约时间，也可在0～4℃下孵育2～16h，测得较高水平的SB。PRc测定时，过去认为由于PRc的含量高，可以用较低浓度胞浆蛋白的胞浆进行测定，我们的结果表明，在1～3 mg/ml胞浆蛋白浓度时，随胞浆蛋白浓度升高，SB进行性增高，因此在胞浆蛋白浓度在此范围内测得的SB是不可靠的，这一点值得注意。PRc的测定宜采用0～4℃孵育，以免受体受热破坏，孵育时间以3～4 h为宜，即缩短实验时间，又保证了结果的可靠，与Mackland[3]的结果相一致。

总之，我们认为DCC法测定ERc、PRc是一种简便易行的方法，所需样本少，实验周期短，并且由于各项影响实验结果的因素容易控制，故方法稳定，测定结果可靠，为临床科研及诊治疾病中可行而实用的一种新的检测手段。

参考文献

1. 陈贵安，等。中华妇产科杂志 1984；19：88
2. 刘以训。生殖与避孕。1978；1(2)：53
3. McGuire WL, et al. Progesterone Receptors in Normal And Neoplastic Tissues. Raven Press, New York, 1977:23～38

(收稿：1988，1，7，修回：1988，6，25)

PVC固定化脲酶膜测定尿素氮的研究

王厚行（野战外科研究所中心室）

临床测定尿素氮常用二乙酰乙肟法，因其要在强酸中煮沸、有异味，特异性、重复性、稳定性均欠佳而深感不便[1]。用Berthelot氏脲酶法测定尿素氮则有反应条件温和、准确、特异、稳定、灵敏的优点；但是脲酶昂贵，而且其活性中心的-SH基极其容易与重金属离子结合而使酶失活，因此对水质和器具的处理要求甚高。为了克服这些缺点，作者试图研制贮存期及使用寿命长的PVC固定化脲酶膜以代替天然脲酶。现将初步结果报告如下。

一、试剂

1. PVC固定化脲酶膜：本室制备。脲酶由四川省校办企业公司生化试剂一厂购得。本研究使用者为3 mg脲酶/11mg膜重。

2. Berthelot氏脲酶法测定尿素氮的试剂参照文献(2)配制。其中，硫酸铵标准溶液与尿素氮标准溶液亦用相应pH值的20mmol/L磷酸盐－10 mmol/L EDTA缓冲液（以下简称缓冲液）配制和稀释。

二、操作

1. 酶活力测定及尿素氮含量测定参照文献（2）。

2. Km值计算按Lineweaver-Burk作图法。

三、结果与讨论

1. **酶膜稳定性** 天然脲酶在室温很快

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