DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.01.016

大鼠肝或肾组织中cAMP和cGMP的同时分离

翟中金 董燕麟（生物化学教研室）

3′,5′-环一磷酸腺苷（cAMP）和3′,5′-环一磷酸鸟苷（cGMP）是激素和某些药物作用的第二信使，对细胞内的物质代谢和各种生理功能均起着对立统一的调控作用，观察这两种核苷酸在组织细胞内的动态变化（特别是对cAMP/cGMP比值的观察）具有重要的理论和临床意义。因而，同时分析小样本的组织细胞中两种核苷酸的浓度尤为重要，由于在一般组织中cAMP含量比cGMP高50～100倍，这两种核苷酸在放免测定中有交叉反应，若不把二者分开，cGMP定量就会出现偏高现象。本文参考Mao[1]等的方法，采用Dowex1×8 Cl^-型树脂柱层析分离肝、肾组织的cAMP和cGMP，然后用放射免疫方法测定其含量，现报告如下。

材料与方法

一、实验动物

180～250g雄性大鼠由本校动物所供给。

二、化学试剂

Dowex1×8 Cl^-型阴离子交换树脂（200～400目）Sigma公司产品；^{3}H-cAMP（比放活性15Ci/mmole）标准，cAMP与cGMP放免测定药合由上海第二医学院同位素室提供）；其它试剂均为分析纯。

三、实验方法

1. 样本的制备：大鼠饥饿12h，断头处死，迅速取出肝肾组织各一小块投入液氮中。取出冷冻组织（以下操作在4℃冷库内进行）称取100～150 mg组织块，投入匀浆器内（盛冷的1 N $HClO_4$ 1 ml），置冰浴中匀浆，5 min后加20%KOH中和，经3 000×g离心15min，吸200μl上清液上Dowex 1×8柱。此处加^{3}H-cAMP或^{3}H-cGMP测定回收率。

2. 柱层析分离cAMP和cGMP：Dowex1×8树脂柱（0.5×8 cm）用水平衡后，加入200μl上清液，先用4 ml水洗脱，弃去流出液，接着加入6 ml 0.5N HCl洗脱，收集开始流出液约3 ml，负压抽干放－20°冰箱用于cAMP的测定；继之用6ml 0.5 N HCl洗脱，收集开始流出液约3ml，抽干后用于cGMP测定。树脂的处理及再生参阅有关文献[3]。

3. 放免测定：将抽干样品溶于1 mlpH7.5、0.4mol/L醋酸盐缓冲液中，采用上二医同位素室提供的放免分析药合测定，用国产Fj-2101G型双道液体闪烁计数器计数放射性；经标准曲线查得pmole值，回归方程计算出pmole/g湿组织重。

结果

Dowex 1×8 Cl^-型树脂柱层析分离cAMP和cGMP结果见图1。两个洗脱峰，cAMP峰出现于0.05N HCl洗脱开始3 ml流出液处，cGMP峰出现在0.5N HCl洗脱开始3 ml流出液处，并且每次洗脱峰型重复性好，具有高的回收率。鼠肝的测定结果表明：^{3}H-cAMP的回收率在85%左右，而^{3}H-cGMP的回收率为74～80%之间。

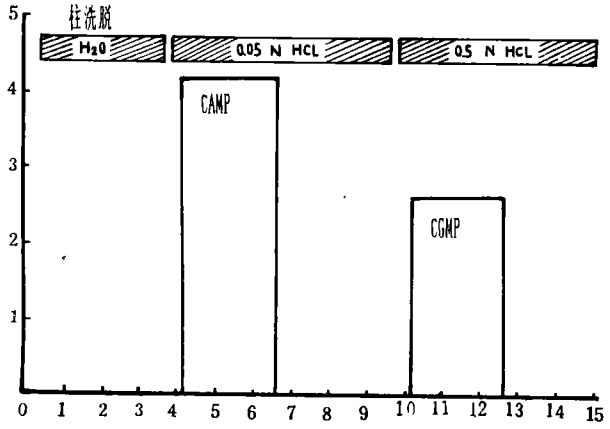
我们分离了8只正常大鼠肝、肾皮质的cAMP和cGMP，用放射免疫法测得结果为：肝脏cAMP含量842.0±198.1（$\bar{X}\pm SD$），cGMP含量为14.88±2.99（$\bar{X}\pm SD$）；肾皮质cAMP含量1298.90±240.62（$\bar{X}\pm SD$），cGMP含量为8.07±1.16（$\bar{X}\pm SD$），（全部数据以pmole/g湿组织表示）。与文献报告结果接近。

讨论

Mao等报道利用层析系统同时分离纯化小组织样本中cAMP和cGMP其重复性和回收率较好[1]，他们先用中性氧化铝柱层析把组织中cAMP和cGMP与其它核苷酸（AMP、ADP、ATP、GMP、GDP、GTP等）分离，

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

然后用Dowex 1 × 2 Cl^-型阴离子树脂（200～400目）将cAMP和cGMP分开。我们参考Mao等方法，省略了中性氧化铝层析纯化一步，减少了纯化过程中cAMP和cGMP的丢失。放免测定cAMP和cGMP特异性高[2]，故可省略纯化步骤，我们用Dowex 1 × 8 Cl^-型阴离子树脂层析效果好，得到重复性好的洗脱峰型（见附图），回收率较高，同样也适用于其它组织细胞中分离。



分步洗脱（ml）

附图　Dowex1×8柱层析分离cAMP、cGMP峰型

参考文献

1. Mao CC & Guidotti A. Simultaneous isolation of adenosine— 3′, 5′-cyclic monophosphate(cAMP) and guanosine3′,5′-cyclic monophosphate (cGMP) in small tissue samples. Analytical Biochemistry 1974; 59:63∽68

2. Goldberg ML. Radioimmunoassay for adenosine 3′, 5′-cyclic monophosphate and guanosine 3′, 5′-cyclic monophosphate in human blood. urine. and cerebrospinal fluid. Clin Chem 1977;23:576～580

3. 徐晓利主译（TG Cooper著）。生物化学工具。人民卫生出版社，1980；148～149

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