

中国药理学报 1981年3月, 2(1): 67—70

## 环鸟苷酸(cGMP)放射免疫测定方法

刘景生 李樾明 王振纲 (中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

王学斌 齐 培 (北京师范大学放射化学教研室, 北京)

蒋滋慧 程桂芳 陈兴国 (军事医学科学院, 北京)

**摘要** 本法用自制 cGMP 与血青蛋白结合制成免疫原, 抗体滴度可达 1:1400, 灵敏度可达 0.15 pmol。

**关键词** cGMP, 放射免疫测定法; 2'-O-琥珀酰环鸟苷酸; 血清

cGMP 和 cAMP 是体内重要调节物质。在体液中 cGMP 含量很低, 需要用放射免疫测定法, 本文介绍抗原及抗体制备过程、免疫技术及其应用。

**一、ScGMP 的制备** 从 cGMP 合成琥珀酰-cGMP(ScGMP)按文献<sup>(1-4)</sup>制备。

1. ScGMP 的分离 cGMP 经琥珀酰化反应后的产物, 通过葡聚糖凝胶 A-50 (QAE Sephadex A-50)  $2 \times 22$  cm 柱层析, 依次用不同浓度 NaAc 溶液洗脱, 最后用 0.2 M NaAc 溶液, 在紫外分光监测仪 (254 nm) 收集约 200 ml。再通过阳离子交换剂 (Molselect SE-25) 柱 ( $H^+$ 型  $2 \times 70$  cm) 脱盐, 除去过量的琥珀酸, 收集峰位洗脱液, 冰冻干燥, 得率约 70—95%以上。

2. ScGMP 的鉴定 产物与 cGMP 在同一纸上层析(正丁醇:乙酸:水 = 12:3:5)时, 产物的  $R_f$  值为 0.24, cGMP 的  $R_f$  值为 0.13。产物呈现一个紫外吸收点, 产物以 0.2 N NaOH 于室温水解不同时间, 然后纸层分离, 结果见图 1。

从图 1 可见水解 60 min 后 ScGMP 全部转变成 cGMP。ScGMP 的紫外吸收光谱与 cGMP 极相似, 但它的最大吸收波长 (255 nm) 与 cGMP 的最大吸收波长 (254 nm) 稍有差异。

ScGMP 水溶液易分解, 纯化操作宜在 20℃以下进行。干燥产品在 -10℃以下至少可

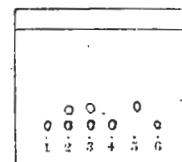


图 1 产物水解后的层析谱(室温) 溶剂: 正丁醇:醋酸:水 = 12:3:5

- |                               |         |
|-------------------------------|---------|
| 1. cGMP + 0.2 N NaOH, 60 min  |         |
| 2. ScGMP + 0.2 N NaOH, 10 min |         |
| 3. ScGMP + 0.2 N NaOH, 30 min |         |
| 4. ScGMP + 0.2 N NaOH, 60 min |         |
| 5. ScGMP                      | 6. cGMP |

保存 6 个月以上。

**二、抗原制备** 取血青蛋白 (从 keyhole limpet(蠔)制备,  $(NH_4)_2SO_4$  沉淀的混悬液) 20 mg/2 ml。在此溶液中加 ScGMP 12.7 mg, 用 0.1 N NaOH 调节至 pH 5.5, 再加 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺 (简称 EDC) 12 mg pH 仍保持 5.5。置暗处, 22—23℃ 保温 24 h, 然后用磷酸缓冲液 (10 mM, 含 150 mM NaCl, pH 7.4) 透析 48 h, 冰冻干燥。于 -10℃ 保存备用<sup>(5)</sup>。

抗原的鉴定: 用 Tris-HCl 缓冲溶液, 50 mM, pH 8, 10 V/cm 进行电泳 3 h, 结果见图 2。

从图 2 可见血青蛋白 + ScGMP 电泳后, 分成蛋白染色点及 ScGMP 的紫外吸收点, 而产物电泳后观察到原点处有紫外吸收点, 染色后在同一位置显蛋白染色点。

从紫外吸收曲线证明产物的紫外吸收既不



图 2 血青蛋白、产物及 ScGMP 电泳图谱

同于血青蛋白,也不同于 ScGMP 的吸收曲线。

按 Warburg 氏法<sup>(6)</sup>, 根据产物在 260 nm 及 280 nm 的消光值计算, 估计每分子血青蛋白(分子量以 1 百万计)接上 ScGMP 80 个分子。

### 三、标记抗原

1.  $[^3\text{H}]c\text{GMP}$ , 21 Ci/mM (英国放化中心)。

2.  $[^3\text{H}]c\text{GMP}$ , 22 Ci/mM (中国科学院原子能研究所标记)。

**四、免疫技术** 取抗原(血青蛋白-ScGMP)生理盐水溶液 2 mg/ml 与等体积的福氏完全佐剂(用活卡介苗代替灭活的卡介苗)制成乳剂(最终浓度为每 ml 含有抗原 1 mg 和活卡介苗 5 mg)。白家兔(2 kg 左右, 雄性大耳)背部皮内注射 30—40 点, 每兔 1 ml, 作为基础免疫。8 周后用同样的乳剂 0.5 ml, 背部皮内多点注射作为加强免疫。以后每隔 4—8 周反复注射 1 次。每次加强注射后 10—14 天, 耳缘静脉取血, 测定抗体滴度。第 4 次加强免疫后, 最高的抗血清滴度达到 1:1400(终浓度)。

### 五、抗体的鉴定

1. 抗体滴度曲线: 抗体的检出采用  $^3\text{H}$  标记的 cGMP(22 Ci/mM), 3000 cpm, (相当于 0.235 pmol), 与不同浓度的抗体反应。50 mM NaAc 缓冲液, pH 6.5, 总体积 200  $\mu\text{l}$ , 0—4°C 培养 4 h 后, 用微孔薄膜过滤, 分离游离及结合的  $[^3\text{H}]c\text{GMP}$ , 然后将微孔薄膜于 70°C 烤干, 置闪烁杯中加甲苯闪烁液 0.4% PPO, 0.01% POPOP 甲苯溶液, 测抗原抗体复合物的放射性。以结合率与滴度绘制滴度曲线, 选

择 40—50% 结合率的抗血清滴度(1:1400)作为放射免疫测定的最终浓度, 见图 3。

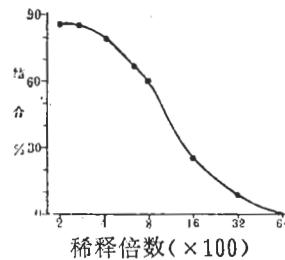


图 3 抗体滴度曲线

2. 标准曲线: 标准 cGMP 的浓度分别为 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 pmol(Cx 管)同时附加 1 管不加标准 cGMP 的 Co 管。测得的放射性以(Co)/(Cx)的比值为纵坐标, 每管所含的标准 cGMP 的 pmol 数为横坐标制作标准曲线。(图 4)

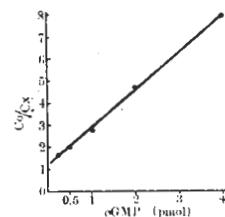


图 4 cGMP 标准曲线

按 Scatchard 法<sup>(7)</sup>: 取 1/400 稀释的抗血清, 加入 0.235 pmol  $[^3\text{H}]c\text{GMP}$ , 作标准曲线, 反应 20 h, 制图法测得亲和常数(K)为  $1.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 。

3. 标准曲线的灵敏度 标准曲线的范围是 0.25—4 pmol, 在制定标准曲线的同时增加 0.15 pmol 的测定管, 此管的计数与 Co 管(不加标准 cGMP 的管)的计数相差 3 个 SD 以上, 有显著差别, 所以这个方法灵敏度为 0.15 pmol。

4. 与 cAMP 的交叉反应 制作标准曲线的同时, 在另外反应管中加入不同量 cAMP(200—1000 pmol)进行测定。结果证明 cAMP 对抗体的抑制竞争与 cGMP 相差  $3 \times 10^3$  倍, 这说明抗体的特异性是比较好的。

(1) 血浆 正常大白鼠血浆 cGMP 含

量为  $28 \pm 6$  pmol/ml, 外加标准回收率为  $102 \pm 18\%$ 。

(2) 样品的稀释曲线 取不同量小白鼠血浆样品进行测定, 从标准曲线查得(cGMP)含量, 结果见图 5。

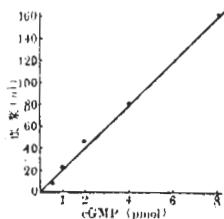


图 5 血浆 cGMP 稀释曲线

样品量在  $20\text{--}80\mu\text{l}$  内线性关系良好, 表明血浆样品中基本无干扰物质。

## 讨 论

cGMP 合成 ScGMP 也是本法必经的过程, 本法得率为 70—95% 以上。

在抗原制备中, 采用血青蛋白作为载体蛋白, 考虑它分子量大, 易产生抗体。血青蛋白溶液的澄明度较差, 紫外光谱测定有一定误差。每个蛋白分子上接上几个分子 cGMP 的计算方法也很粗略, 因此, 计算出来每分子血青蛋白接上 cGMP 80 个分子, 实际上只能是个估计数。

家兔第 1 次免疫后, 过 2 个月再加强免疫

1 次, 即产生抗体。但滴度不高, 2 次加强后滴度上升很快。4 次加强后滴度又有上升。看来产生一定滴度能使用的抗体时间在 6 个月左右。

目前的抗体是以 [ $^3\text{H}$ ]cGMP 为标记抗原进行测定的, 标准曲线范围为  $0.25\text{--}4$  pmol, 这对一般组织内 cGMP 含量的测定是理想的, 但对某些 cGMP 含量较低的样品则灵敏度还不够, 需要进一步合成碘标记的抗原, 再结合样品的乙酰化, 灵敏度可以提高数十倍, 才能满足测定要求。

致谢 本文经金荫昌教授审阅

## 参 考 文 献

- 1 田村公滋(ほか 2 名). 公开特许公报 1976 年 9 月 8 日; 特開昭 51-101983
- 2 Sasse K. Organische Phosphorverbindungen. In: Müller E, hrsg. *Methoden der organischen Chemie*, Band 12/2. 4. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme, 1964: 280
- 3 Herber JF, Thompson QE. US Patent (3, 531, 550) 1970 Sep 29: 878 (5): 1385
- 4 Cailla HL, Vannier CJ, Delaage MA. *Anal Biochem* 1976 Jan; 70 (1): 195
- 5 Steiner AL, Parker CW, Kipnis DM. *J Biol Chem* 1972 Feb 25; 247 (4): 1106
- 6 Dawson RMC, Elliott DC, Elliott WH, Jones KM. *Data for biochemical research*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1969: 625-6
- 7 Zettner A. *Clin Chem* 1973 Jul; 19 (7): 699

*Acta Pharmacologica Sinica* 1981 Mar; 2 (1): 67—70

## RADIOIMMUNOASSAY FOR GUANOSINE 3',5'-CYCLIC PHOSPHATE (cGMP)

LIU Jing-sheng, LI Yue-ming, WANG Zhen-gang

(Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

WANG Xue-bin, QI Pei (Department of Radiochemistry, Beijing Normal University, Beijing)

JIANG Ci-hui, CHENG Gui-fang, CHEN Xing-guo

(Chinese Academy of Military Medical Sciences, Beijing)

**ABSTRACT** Since the content of cGMP in tissue fluids is less than  $1/10$  of that of

cAMP, it is difficult to measure cGMP with general protein binding competitive me-

thod. A radioimmunoassay was established by us. This method required no purification of the sample, thus making the cGMP measurement as easy as that of cAMP.

cGMP was synthetized by us. Purified cGMP solution was mixed with succinyl anhydrideto form 2'-O-ScGMP. By passing through QAE-Sephadex A-50 columns, nearly 95% of it was recovered. Then ethyl dimethyl aminopropyl carbodiimide-HCl was used to conjugate with hemocyanin to produce an immunogen. Each molecule of hemocyanin was able to conjugate about 80 molecules of cGMP.

Antiserum to cGMP was obtained by multiple subcutaneous injections on the back of rabbits (a total of 1 mg cGMP/rab-

bit at each immunization). Booster dosage was given every other month. Blood for antiserum was collected on 10—14 d after the last booster dosage. Finally the titre of the antibody in RIA was 1:1400. The specific acivity of [<sup>3</sup>H] cGMP was 22 Ci/mmol.

A typical standard curve was plotted from 0.25—4 pmol/tube, and the sensitivity could reach 0.15 pmol/tube. The cross reactivity to cAMP with cGMP antiserum was not significant.

This method has been applied in several biological researches.

**KEY WORDS** cGMP; RIA; 2'-O-ScGMP; antiserum