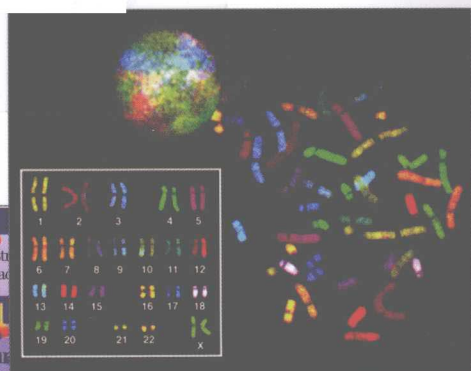
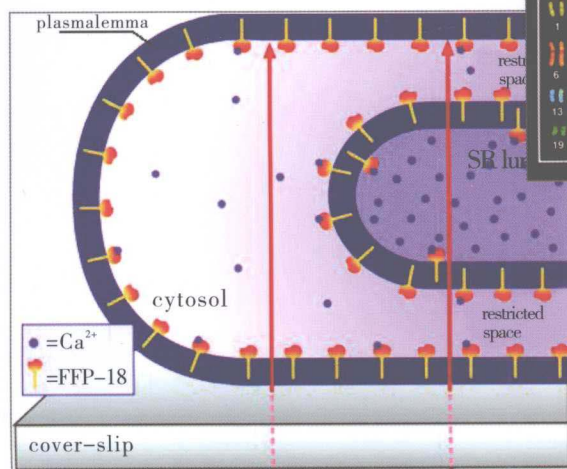


“十一五”国家重点图书出版规划项目

生理学实验技术丛书

内分泌生殖生理学 实验技术方法及其进展

主编 朱妙章 倪江 迟素敏 王晓红



第四军医大学出版社

“十一五”国家重点图书出版规划项目
生理学实验技术丛书

内分泌生殖生理学实验技术 方法及其进展

第四军医大学出版社·西安

图书在版编目(CIP)数据

内分泌生殖生理学实验技术方法及其进展/朱妙章等主编. —西安:第四军医大学出版社,2010.2

ISBN 978-7-81086-739-9

I. 内… II. 朱… III. 内分泌学:生殖生理学—实验 IV. Q45-33;Q492-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2010)第024098号

内分泌生殖生理学实验技术方法及其进展

主 编 朱妙章 倪 江 迟素敏 王晓红
责任编辑 富 明
出版发行 第四军医大学出版社
地 址 西安市长乐西路17号(邮编:710032)
电 话 029-84776765
传 真 029-84776764
网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>
印 刷 西安力顺彩印有限责任公司
版 次 2010年3月第1版 2010年3月第1次印刷
开 本 787×1092 1/16
印 张 16 彩 0.25
字 数 500千字
书 号 ISBN 978-7-81086-739-9/Q·31
定 价 66.00元

(版权所有 盗版必究)

编 者

马元怡	马夜肥	王 珺	王 然	王云雅	王云霞
王化宁	王成海	王晓红	毕聪明	吕春梅	朱妙章
刘 军	刘 玲	刘 赛	刘 磊	刘亚莉	刘国艺
刘惠迪	闫 彦	苏玉虹	李 臻	肖晓辉	吴 瑞
邹晓娟	汪 静	迟素敏	张庆红	张国栋	张春虹
张荣怀	罗亚宁	周晓东	赵 薇	赵玉峰	胡玉珍
姜恩魁	夏 峰	倪 江	倪 鑫	郭海涛	唐晓露
曹雪峰	彭正午	蒋春雷	韩蕊娜	温海霞	潘桂兰

前 言

《生理学技术与方法》于 20 世纪 80 年代由科学出版社出版,对推动我国生理科学的发展起了重要作用。时隔二十多年,生命科学、医学的发展,特别是分子生物学、生物医学工程等学科技术的迅猛发展,使得人们对生命现象和疾病本质的认识逐渐推进深入,也使临床上对疾病的实验室诊断发生了革命性变化,进而推动了生命科学和医学的进步——传统概念不断更新,新理论、新观点和新信息不断涌现,科学研究从整体、离体器官水平不断向细胞水平和分子水平深入。同时,我们也看到,每一项理论的重要进展都是与新技术、新方法的应用密切相关,每项技术创新都使我们对相关理论的认识不断向前迈进。新技术、新方法和新仪器的应用孕育了新的机遇,并已成为指导科技工作者迈向成功的工具。这些新的技术、方法都分散在不同的期刊和书中,许多读者苦于寻找实验技术与方法的书刊,尤其是近年来,众多先进的研究手段不断问世与发展,如单细胞研究方法、膜片钳技术、心肌细胞收缩力的测定、激光共聚焦显微镜技术、相关基因的表达克隆、基因芯片等技术在生理学研究中得到了广泛的应用,学习和掌握这些技术与方法,对选择适宜的科研手段与完善科研设计有极其重要的帮助。因此,有必要出版一本介绍生理科学中近二十几年使用的实验方法与技术及其进展的书。

在生物体,内分泌和生殖功能参与全身的代谢、生长、发育、衰老等生命过程,实现生命延续的重要功能,是机体神经 - 内分泌 - 免疫网络的重要组成部分。本书主要介绍了内分泌、生殖系统的生理学实验技术方法、经验和技巧,有助于科学工作者应用这些技术方法去证明自己的假设和研究设想。在从事科学实验研究时,研究生和年轻的科技工作者要注意以下几点:①要仔细观察,因为任何发明都始于观察。并要结合所用的方法和条件,分析实验条件和结果之间的因果关系。②要有强烈的好奇心。随时记录与预期不一致的现象和结果,分析其可能的原因,好奇心会促使你观察并进行试探,这往往可能带来智慧的“奇花异果”。③要不怕失败。实验材料都是有生命的东西,可因各种条件不同而变化,实验常会失败,创造性实验更会遇到失败。失败是成功之母,要不怕受挫折,

意志和毅力是十分重要的。④要发现问题,要多动脑,书中介绍的实验技术方法基本是成熟的,但不一定是最好的方法,当实验技术应用到不同种系动物、不同器官和不同细胞,或者使用不同仪器,处于不同实验环境时,改进或改变技术方法都是必要的。我们希望读者在使用本书时,能引出更多、更高技术方法的实验设计与构思,这是编者的目的之一。提出新设想,这是创造性思维过程的起点和动力。

参加本书编写的有第四军医大学、哈尔滨医科大学、西安交通大学医学院、浙江大学医学院、武汉大学医学院、大连大学医学院、山西医科大学、大连医科大学、首都医科大学、南京医科大学、第二军医大学、辽宁医学院、泸州医学院、包头医学院、黑龙江中医药大学、嘉兴学院、中国科学院上海生命科学研究院和中国医学科学院药物研究所等 21 个单位,其中包括很多造诣深、有特长、经验丰富的教授与学者参加撰写或审修,对保证文稿的科学性、先进性和实用性起到重要作用。希望读者从现有的理论和技术方法中,摸索和领悟科研课题的设计与研究思路。本书在写作方法上,着重于实验方法与技术的介绍,力求使从事基础医学、临床医学和生命科学的科研工作者读后能顺利开展相关工作。书中的彩图集中排在书末,图序号与文中相同。

本书为“十一五”国家重点规划图书,以分册形式出版。作者按实验技术方法的编写要求撰稿,其与教材编写不同,实验技术较零散,写作方法和深浅程度不易掌握,主编与刘亚莉副教授、郭海涛博士对书稿进行了多次修改,对他(她)们的辛勤劳动表示衷心的感谢。但书稿中可能仍有错漏,恳请大家批评指正。本书出版后,希望能听到读者的意见和建议,以便把后续的几个分册写好。

朱妙章 倪 江 迟素敏 王晓红

2009 年 12 月

目 录

第一篇 内分泌生理学实验技术

第一章 大鼠内分泌细胞实验技术	(1)
第一节 大鼠腺垂体细胞原代培养	(1)
第二节 大鼠腺垂体生长激素细胞的分离	(2)
第三节 大鼠胰岛的分离技术	(3)
第二章 放射免疫分析	(5)
第一节 基本原理	(5)
第二节 放射性同位素标记	(6)
第三节 放射免疫分析系统的建立	(11)
第四节 样品的前处理	(14)
第五节 放射免疫测定的质量控制	(16)
第三章 放射性配体结合分析法	(18)
第一节 概述	(18)
第二节 样本的制备和配体的选择	(18)
第三节 实验方法和数据分析	(19)
第四章 血清内分泌激素的放射免疫(RIA)分析	(23)
第五章 ELISA 检测大鼠生长激素浓度	(31)
第六章 血清中脂肪含量的测定	(32)
第一节 脂肪测定的意义	(32)
第二节 甘油的检测	(32)
第三节 脂质生成的检测	(34)
第四节 脂肪溶解的检测	(36)
第七章 内分泌细胞钙离子测定技术	(38)
第一节 电极法	(38)
第二节 同位素示踪法	(39)

第三节	磁共振法	(39)
第四节	高流通量测定法	(39)
第五节	荧光钙离子测定常用探针及技术	(40)
第八章	大鼠腺垂体离体灌流系统——动态监测促性腺激素的分泌	(53)
第九章	苯甲酸雌二醇诱导大鼠原位与异位垂体催乳素瘤	(55)
第十章	应激反应动物模型	(57)
第一节	急性应激动物模型	(57)
第二节	慢性应激动物模型	(58)
第三节	束缚应激动物模型	(59)
第四节	大鼠应激性溃疡模型	(60)
第五节	热应激动物模型	(62)
第六节	慢性寒冷应激高血压大鼠模型	(64)
第七节	Tako-Tsubo 心肌病大鼠模型	(65)
第八节	连续非恒定噪音诱发的听源性高血压	(67)
第九节	悬尾实验	(67)
第十节	足底电击应激模型	(68)
第十一章	实验动物糖尿病模型	(70)
第一节	实验动物自发性糖尿病模型	(70)
第二节	实验动物诱发性糖尿病模型	(72)
第三节	实验动物转基因糖尿病模型	(74)

第二篇 生殖生理学实验技术

第十二章	生殖研究常用实验动物的生殖特点及选择标准	(76)
第一节	生殖生理学研究常用实验动物及选择	(76)
第二节	生殖生理学研究常用实验动物的生殖生理特点	(80)
第十三章	男(雄)性生殖实验技术	(90)
第一节	精液常规检查	(90)
第二节	精子功能的检测	(98)
第三节	精浆生化及微量元素的测定	(104)
第四节	X、Y 精子分离技术	(116)
第五节	精子优选技术	(121)
第六节	精子染色体制备技术	(123)
第七节	雄性小鼠生殖细胞染色体标本制备及形态观察	(125)
第八节	精液免疫学检测	(127)

第九节 精子染色技术	(128)
第十节 精子体外获能	(131)
第十一节 睾丸细胞培养	(133)
第十二节 啮齿类动物精子标本制备及形态观察	(136)
第十四章 女(雌)性生殖实验技术	(138)
第一节 卵巢功能实验	(138)
第二节 细胞培养	(143)
第三节 输卵管和子宫平滑肌活动的实验方法	(151)
第四节 低温生物学技术	(154)
第五节 体外受精技术	(158)
第六节 卵母细胞质内单精子注射	(160)
第七节 克隆-细胞核移植	(162)
第八节 经阴道子宫输卵管超声造影的临床应用	(164)
第十五章 常用的实验动物模型	(167)

第三篇 人类辅助生殖实验技术

第十六章 辅助生殖技术实验室的建立与运行	(177)
第一节 辅助生殖技术实验室的建立	(177)
第二节 辅助生殖实验室的管理和质量控制	(181)
第十七章 精子的获取与制备技术	(187)
第一节 精子的获取技术	(187)
第二节 ART 中常用的精子制备技术	(190)
第十八章 体外受精-胚胎移植技术	(193)
第一节 卵母细胞的收集	(193)
第二节 受精	(196)
第三节 胚胎培养	(199)
第四节 胚胎质量评估	(206)
第五节 胚胎移植时间的选择	(209)
第十九章 显微操作技术在 ART 中的应用	(213)
第一节 显微授精技术	(213)
第二节 人工辅助孵化	(219)
第三节 胚胎活检	(222)
第四节 其他显微操作	(223)

第二十章 胚胎植入前遗传学诊断技术	(228)
第一节 植入前遗传学诊断的标本来源和取材方法	(228)
第二节 植入前遗传学诊断技术	(230)
全书参考文献	(238)

第一篇 内分泌生理学实验技术

第一章 大鼠内分泌细胞实验技术

第一节 大鼠腺垂体细胞原代培养

一、原理

采用酶消化法分次消化腺垂体,进行原代培养。

二、材料

SD 大鼠、胰蛋白酶、胶原酶、DNA 酶 I、DMEM 等。

三、方法

1. SD 大鼠经 1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉,打开胸腔,剪破心脏放血,用 75% 酒精浸泡后移入细胞培养室,开颅取腺垂体。
2. 将腺垂体用 D - Hank's 液依次冲洗三次,移入青霉素瓶内剪碎至糊状,分别加入 0.375% 胰蛋白酶、600U/ml 胶原酶和 200U/ml DNA 酶 I (1:1:1),37℃ 振荡消化 30 分钟,吸管吹打,吸出细胞悬液移入含有新生小牛血清的 DMEM 培养液内中止消化,4℃ 保存。余下的未消化的组织块补加消化酶,37℃ 二次消化 20 分钟。
3. 终止消化后,1000rpm 离心 5 分钟,弃上清液,加 DMEM 培养液 5ml,轻吹起细胞,1000rpm 离心 5 分钟,弃上清液,加入含 100ml/L 小牛血清的 DMEM 液,吹打均匀。
4. 用血细胞计数板镜检细胞计数,调整细胞密度,以 5×10^8 /L 的密度接种于直径 6cm 的培养皿和 96 孔板内,移入 CO₂ 孵箱中,在 37℃、50ml/L CO₂ 及饱和湿度条件下培养,24 小时后换液,之后每隔 48 小时换液一次。

四、注意事项

1. 为避免残留的血液影响消化效果,要充分放血。
2. 取腺垂体时要小心,力度适中,避免把垂体夹碎。

(刘亚莉 迟素敏)

第二节 大鼠腺垂体生长激素细胞的分离

一、原理

采用酶消化法分次消化获得的腺垂体细胞,再利用密度梯度分离法分离,获得生长激素细胞。

二、材料

SD 大鼠、胰蛋白酶、胶原酶、DNA 酶 I、DMEM、Percoll 分离液、注射器、长注射针头等。

三、方法

1. SD 大鼠腺垂体细胞分离消化后,加新生小牛血清中止消化,1000rpm 离心 5 分钟,弃上清液。

2. 加入 M199 1 × 培养液 3ml,吹打均匀,同时配制 Percoll 细胞分离液,密度分别为 1.043、1.073、1.101 各 3ml,将梯度分离液由轻到重依次加入 15ml 离心管,最后加入 3ml 的腺垂体细胞悬液,4℃,2400rpm 离心 35 分钟。

3. 抽取生长激素层次(1.043 和 1.073 之间)的细胞移入含 100ml/L 小牛血清的 DMEM 液中,吹打均匀,以 5×10^4 /L 的密度接种于 24 孔板(孔内预置 10mm × 10mm 的盖玻片),每孔 200 μ l,待 2 小时后细胞贴壁时补加培养液 300 μ l,移入 CO₂ 孵箱中,在 37℃、50ml/L CO₂ 及饱和湿度条件下培养,24 小时后换液,之后每隔 48 小时换液一次。

4. 免疫细胞化学染色鉴定。大鼠 GH 细胞培养至第 4 天,吸弃培养液,加入 4% 的多聚甲醛固定 30 分钟,然后以 100% 甲醇 + 0.3% 过氧化氢处理以去除内源性过氧化物酶活性,山羊血清封闭非特异抗原。加兔抗大鼠 GH 的抗体,工作浓度为 1:3000,4℃ 孵育 48 小时,然后行 ABC 免疫细胞化学染色,DAB 呈色、脱水、透明、中性树胶封片,镜检观察,胞浆有棕黄色着色者判定为阳性。对照组:用 PBS 及正常血清替代一抗进行免疫细胞化学染色,其余步骤同实验组,显色结果为阴性。

四、注意事项

1. 加入 Percoll 细胞分离液时,一定要注意加入顺序,避免加错;同时力度要轻,避免各层液体混合。

2. 抽取生长激素细胞时注意尽量避免吸出其他层次的细胞,以免获得细胞纯度下降。

(刘亚莉 迟素敏)

第三节 大鼠胰岛的分离技术

胰岛是分泌胰岛素和胰高血糖素等激素的内分泌组织,胰岛功能失常是糖尿病的主要病理变化。离体胰岛功能研究极大地促进了人们对胰岛素合成分泌的分子机制的认识,并深化了对糖尿病发病机制的理解,为预防和治疗糖尿病提供了坚实的基础。直到目前,离体胰岛功能研究一直是糖尿病研究的常规手段,也是内分泌研究的重要技术方法。

有效的胰岛分离、纯化技术是胰岛相关研究的前提,然而,胰岛分离并非十分容易的过程。这主要是由于胰岛并不像垂体、甲状腺、肾上腺等内分泌腺体独立存在,利于分离。胰岛像一个个独立的小岛散在分布于胰腺中,而且只占到胰腺的2%左右。其散在分布和比例极少成为胰岛分离的主要困难。研究人员一直在努力寻找一个有效的胰岛分离方法,直到经胆总管注液扩充胰腺进行消化的方法创建后,胰岛分离才从纯度和数量上得到突破,逐渐成为胰岛分离的常规技术。

一、原理

采用胶原酶消化的方法充分离散胰岛和胰腺外分泌组织,并保持胰岛的完整性,运用密度梯度离心法分离和收集胰岛。

二、材料

1. 试剂 V型胶原酶、Hank's液、DNA酶、Histopaque-1077、RPMI1640培养液、Dispase等(均可购自Sigma试剂公司)。

2. 仪器 手术器械、注射器、26G注射针头、水浴箱、离心机、倒置显微镜、体视显微镜、解剖显微镜、CO₂恒温培养箱。

三、步骤

大鼠麻醉处死并用75%酒精消毒后,做腹壁正中切口,暴露腹腔,找到胰腺和胆总管,用止血钳在十二指肠的开口结扎胆总管。在体视显微镜下,用注射器从胆总管向胰腺灌注约10ml消化酶液,同时观察胰腺膨胀情况,胰腺在注射过程中逐渐膨大是注射成功的标志。注射完毕,立即摘取胰腺组织,放于50ml离心管中,置于冰上。然后同法摘取其他大鼠的胰腺。在摘取胰腺时,小心地从胃、十二指肠、小肠、大肠以及脾脏游离胰腺,防止剪破肠道而造成污染。游离胰腺时,用眼科剪仔细修剪连接在胰腺上的血管、脂肪组织和结缔组织。将收集的胰腺置于37℃恒温水浴箱静置消化30分钟,然后加入预冷的RPMI1640培养液40ml终止消化。用手上下振摇离心管,充分打散胰腺组织;用孔径500 μ m的筛网过滤,除去未完全消化的组织之后,500rpm离心2分钟,倒掉上清液,加入RPMI1640培养液清洗组织,重复以上三个步骤3~5次,直至离心后上清液中无杂物。完全倒掉上清液,加入Histopaque-1077约5ml,充分混匀,移入15ml离心管,然后小心加入RPMI1640约3ml,形成一个层面。逐渐加速至800g离心15分钟。在RPMI1640与Histopaque-1077形成的层面上收集胰岛。RPMI1640清洗2次后,用含血清培养液培养,或进一步消化成单细胞用于实验。胰岛获得率

的差异报道很大,这与各个实验室掌握的分离技术的成熟程度以及所用方法的差异有关。上述方法的胰岛获得率在本作者的实验室为每个胰腺约 300~500 个。

胰岛的分散:用蛋白酶分散胰岛成为单个细胞。具体步骤如下:无钙分离液清洗胰岛,然后加入 3ml 蛋白酶消化液,室温下振摇(100 次/分)5 分钟,吸管吹打分散后静置 30 秒,收集含有分散细胞的上清液,用完全培养液终止消化,置于 4℃ 下,将其余未完全消化的组织块继续消化。如此反复 2~4 次,直到所有胰岛被消化分散成单个细胞。将所有细胞用完全培养液清洗 2 次,收集细胞,加入培养液,以 $10^5/\text{ml}$ 的密度种植于培养皿或玻片中央,置于 5% CO_2 孵箱, 37℃ 培养。第 2 天换液,此后每 3 天换液一次,培养第 3 天至第 5 天的细胞用于实验。

胰岛分离以及分散用的消化液配制如下。

胶原酶液 (0.1%) : NaCl, 124mmol/L; KCl, 4.7mmol/L; CaCl_2 , 2.4mmol/L; MgSO_4 , 1.2mmol/L; KH_2PO_4 , 1.2mmol/L; NaHCO_3 , 2.4mmol/L; HEPES, 5mmol/L; V 型胶原酶, 1g/L; DNA 酶, $10\mu\text{g}/\text{L}$ 。

无钙分离液: NaCl, 135mmol/L; KCl, 4.7mmol/L; MgSO_4 , 1.2mmol/L; KH_2PO_4 , 1.2mmol/L; NaHCO_3 , 2.4mmol/L; HEPES, 10mmol/L; EDTA, 0.2g/L。

胰岛分散用蛋白酶消化液:无钙分离液, Dispase, 1mg/ml; DNA 酶, $10\mu\text{g}/\text{L}$ 。

四、胰岛的鉴定

1. **胰岛纯度的鉴定** 胰岛用 DTZ 鉴定。DTZ 是锌结合性化合物,与锌结合后呈深红色。由于胰岛素细胞中含锌,故 DTZ 可将胰岛染成深红色,而胰腺外分泌组织不着色。DTZ 溶液配制:10mg DTZ 溶于 3ml 无水乙醇中,加入 3 滴 1mM 氨水溶液,形成深红色母液,用 Hank's 液 1:10 稀释,然后加入到收集的胰岛细胞中检测收获纯度。

2. **胰岛细胞活性鉴定** 配制 0.75mM 碘化啉啉(PI)储存液和 0.025mM 二醋酸酯荧光素(FDA)储存液。吸取 $50\mu\text{l}$ 充分混匀的胰岛细胞悬液加入盛有 $450\mu\text{l}$ RPMI1640 培养液的培养皿中,先后加入 $10\mu\text{l}$ PI 和 $10\mu\text{l}$ FDA 染液,混匀。倒置荧光显微镜下(激发光波长 490nm)观察胰岛细胞团呈绿色即为活细胞,红色为死细胞。检测 50 个胰岛细胞中活细胞比率。

3. **胰岛细胞培养和功能鉴定** 解剖显微镜下吸取约 50 个胰岛细胞,先放入 2.8mmol/L 低糖中 37℃ 孵育 1 小时,再用移液器将胰岛细胞转移至 25.0mmol/L 高糖中 37℃ 孵育 1 小时。分别用试管收集孵育液,放射免疫分析法检测孵育液中胰岛素水平,鉴定胰岛的分泌功能。

五、注意事项

1. 严格控制消化温度和时间,维持 pH 值稳定于 7.4,消化液与胰腺的体积比大于 5:1。
2. 为避免残留血液影响酶的作用效果,处死大鼠时应充分放血。
3. 胆管注射时,注射位置要在最低一支胆管与主干的汇合支以下,防止酶液倒流至肝。
4. 灌注时加压应先小后大,保证胰腺尽可能充盈。
5. 胶原酶液溶解后应注意冰冻保存,灌注好的胰腺也应保存在 4℃。
6. 严格控制胰腺的消化时间。
7. 胰腺消化分散后,应立即加入预冷的 RPMI1640 液终止消化。

(赵玉峰 胡玉珍 张荣怀)

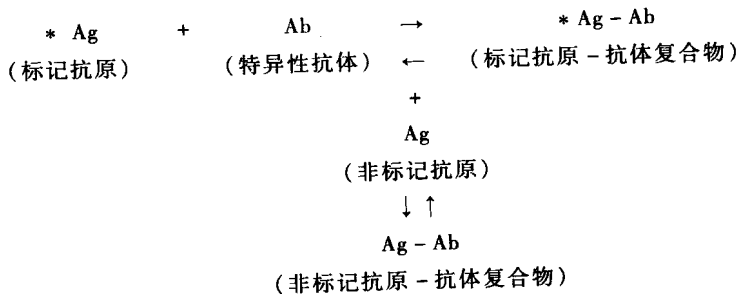
第二章 放射免疫分析

1960年,美国学者 Yalow 和 Berson 创立了放射免疫分析(radioimmunoassay, RIA)法,并首先用于糖尿病患者血浆中胰岛素含量的测定。这是定量分析方法的一项重大突破,开辟了医学检测史上的一个新纪元。它使得那些原先认为是无法测定的极微量而又具有重要生物学意义的物质得以精确定量,为进一步揭开生命奥秘打开了一条新的通路,使人们有可能在分子水平上重新认识某些生命现象的生化生理基础。其后 30 年中,内分泌科学的飞速发展,充分证明了这一超微量分析技术的巨大推动力。为此,该项技术的发明者于 1977 年荣获诺贝尔生理学 and 医学奖。这一新技术迅速渗透到医学科学的其他领域,如病毒学、药理学、血液学、免疫学、法医学、肿瘤学等,以及与医学生物学相关的学科,如农业科学、生态学及环境科学等。放射免疫测量的物质从激素扩大到几乎一切生物活性物质。

第一节 基本原理

RIA 是把放射性同位素测定与抗原和抗体间的免疫化学反应两种方法巧妙地结合起来所形成的一种超微量物质的测定方法。

RIA 的基本原理是利用标记抗原(*Ag)和非标记抗原(Ag)对特异性抗体(Ab)发生竞争性结合。竞争结合反应可用下式表示:



在上述反应系统当中,当只有 *Ag 和 Ab 时,只产生 *Ag-Ab 复合物,并保持可逆的动态平衡。当反应系统中同时加入 Ag,因 Ag 与 *Ag 免疫活性完全相同,因此与 Ab 具有相同的亲和力。当 Ag 为一定量、Ab 为有限量且 Ag 与 *Ag 的量之和超过 Ab 上的有效结合位点的亲和力。当 Ag 为一定量、Ab 为有限量且 Ag 与 *Ag 的量之和超过 Ab 上的有效结合位点的亲和力。当 Ag 为一定量、Ab 为有限量且 Ag 与 *Ag 的量之和超过 Ab 上的有效结合位点的亲和力。即当 Ag 量多时,Ag-Ab 生成量多,而 *Ag-Ab 生成量减少,从而游离的 *Ag 增多;相反,当 Ag 量少时,Ag-Ab 生成量减少,*Ag-Ab 生成量增多,游离的 *Ag 减少。可见 *Ag-Ab 复合物生成量是受 Ag 含量制约的。因此,在放射免疫分析中,用已知不同浓度的标准物和一定量的 *Ag 及限量

的 Ab 反应,采取一定方法将结合标记物(B)即 $Ag-Ab$ 与游离标记物(F)即 $*Ag$ 分开,即可算出该标准物在各浓度下 $*Ag-Ab$ 复合物的结合百分率(B/T)。在实际工作中,以 B/T 的值为纵坐标,标准物的浓度为横坐标,绘成曲线,即竞争性抑制曲线,或称标准曲线。将未知浓度的样品按同样条件操作,所得结合率(%)与标准曲线相比,即可查出样品中待测抗原的浓度。

放射免疫分析的基本操作程序如下:首先配制一系列已知浓度的标准溶液,在其中加入一定量的标记抗原和特异抗体;在一定条件下使之反应达到平衡后,采取适当方法将 B 与 F 分离,分别测量其放射性,绘制标准曲线(图 1-2-1)。样品中的抗原则可在相同的条件下操作,在标准曲线上查得含量。

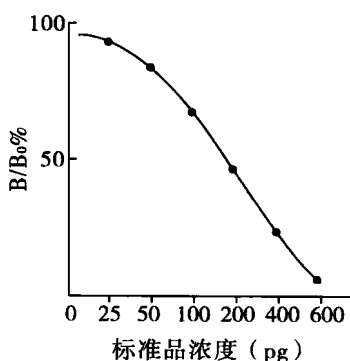


图 1-2-1 标准曲线(B_0 为最大结合率)

由此可见,要成功地进行放射免疫分析,必须解决好以下三个关键性技术问题:

1. 标记抗原 要求其纯度高、免疫化学活性好、比放射性强及用量适当。
2. 抗体 要求其特异性高、选用的稀释度适当。
3. 分离 B 与 F 理想的分离方法应当是分离完全、稳定可靠、操作简单、适用范围广。

第二节 放射性同位素标记

在 RIA 中,标记抗原质量的优劣,直接影响测定结果,必须制备高比度、高纯度的标记抗原,并保持免疫活性不丧失。

一、同位素的选择

标记抗原常用的放射性同位素有 3H 、 ^{14}C 、 ^{131}I 和 ^{125}I 等。在使用上各有其优缺点,可根据所进行的放射免疫分析的类型、特点、标记物制备和供应情况以及实验室设备条件等做适当的选择。大多数抗原分子中都含有 C、H 等原子,所以用 ^{14}C 或 3H 标记不改变抗原的结构及其免疫学活性,且 ^{14}C 、 3H 半衰期长,所标记的抗原长时间放置后仍可使用,这都是其优点。但不足之处在于 ^{14}C 或 3H 标记的操作较繁琐,并难以获得高比放射性的标记物; 3H 及 ^{14}C 放出的都是弱 β 射线,需用较昂贵的液体闪烁计数器方能获得较高效率的测量,且测定操作也

较麻烦。但某些抗原用放射性碘标记容易造成免疫化学或生物学活性改变者,则仍以 ^3H 或 ^{14}C 为标记物最佳。

大多数抗原分子中是不含碘的,引入碘原子就改变了抗原的分子结构,往往容易损伤抗原的免疫化学活性,且放射性碘的半衰期较短,标记物放置后因衰变使放射性降低,因而需要经常制备标记物或要求能定期提供放射性碘标记物。但放射性碘标记操作简便经济,容易获得高比放射性标记物,对大多数抗原、抗体的放射性碘标记都能适用,放射性碘放出 γ 射线,用一般晶体闪烁计数器就能获得较高效率而精确的测量,测量操作也很简单。由于这些突出的优点,目前在放射免疫分析中,使用放射性碘标记物最多。

从应用角度来讲, ^{131}I 和 ^{125}I 又各有其优缺点,可根据实验的要求、仪器的条件和放射性碘制剂的规格等条件合理选用。但相对而言, ^{125}I 有较多的优点,一是半衰期允许标记化合物的商品化及贮存应用一段时间;二是它的辐射自分解少,标记化合物有足够的稳定性。放射性碘适用于放射免疫分析许多对象(包括蛋白质、肽类、固醇类、核酸类以及环型核苷酸衍生物等)的标记,且操作简单,一般实验室都不难做到。

二、放射性碘标记法

要制备高比度、高纯度与免疫化学活性好的标记物,首先要有高纯度、良好免疫活性的抗原。用作放射标记的抗原应当是高度纯化的,微量污染的杂质可影响标记物的质量。标记物的纯度会影响放射免疫分析的特异性,所以若用纯度不高的抗原作标记,则标记后必须采取适当的步骤除去杂质,以获得高纯度的标记物。有了好的纯抗原,还要采用适当方法加以标记,尽量获取高比放射性而又能保持良好的特异免疫化学活性的标记物。这些都是放射免疫分析能取得高特异性和高灵敏度的关键问题。

多肽激素与蛋白质多用碘标记,最常用的是 ^{125}I 。放射碘化标记一般采用氧化法,常用的有氯胺T法、一氯化碘法、电解碘化法及酶法等几种方法。不管采用哪一种放射性碘标记法,标记的化合物内部都必须有碘原子可结合的基团,即结构上要含有酪氨酸残基酪基或组织胺残基。凡蛋白质、肽类等抗原,在结构上含有上述基团的可直接用放射性碘进行标记。如不含上述基团的,放射性碘无法标记,必须在这些化合物的结构上连接上述基团后才能进行碘标记。

(一)氯胺T法

氯胺T法标记效率高、重复性好、试剂便宜易得,是目前使用最多的碘标记方法。

【原理】

氯胺-T(Chloramine-T)是一种强氧化剂,能使碘阴离子氧化成碘分子。取代肽链上酪氨酸苯环上羟基位的一个或两个氢,使之成为含有放射性碘化酪氨酸的多肽链。标记后再用还原剂偏重亚硫酸钠终止反应,该法适用于所有携带酪氨酸残基的蛋白质。

【方法】

以 ^{125}I -ACTH的制备为例。

1. 碘化反应 ACTH $5\mu\text{g}$ + 0.5mol/L PBS $50\mu\text{l}$ (pH 7.5) + ^{125}I $2.96 \times 10^7 \text{ Bq}$,混匀后,加入新配置的氯胺-T $30\mu\text{g}/15\mu\text{l}$ (0.05mol/L PB, pH 7.5)。迅速振荡混匀,室温下反应40秒。

2. 终止碘化反应 加入还原剂偏重亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) $40\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ (0.05mol/L PB, pH 7.5),以终止碘化反应。