

〔美〕 W. T. 施拉德利 编著
B. W. 奥马利

激素作用与分子内分泌学的 实验方法手册

科学出版社

内 容 简 介

本书详细地介绍了研究分子生物学和分子内分泌学的实验室操作方法。全书共有十四章：前三章介绍类固醇激素受体和肽类激素质膜受体的基本概念、测定、纯化以及特性的研究方法；第四章至第八章全面地介绍基因工程的主要技术；第九章至第十二章叙述研究激素作用原理的基本技术；第十三章和第十四章分别介绍研究真核基因表达的方法和组织培养技术。

本书内容全面，概念明确，条理清楚，并辅以图表，易于理解。可供大专院校生物、生化、医药的教师和学生的参考书，也可作为从事分子生物学、内分泌学、医学的科学研究工作者和技术人员的工具书。

W.T.SCHRADER, B.W.O'MALLEY
LABORATORY METHODS MANUAL FOR HORMONE ACTION
AND MOLECULAR ENDOCRINOLOGY
1982, Sixth Edition

激素作用与分子内分泌学的实验方法手册

〔美〕 W. T. 施拉德 B. W. 奥马利 编著

曹咏清 邹继超 沈孝宙 张世荣 译
刘展环 冯北元 庄临之 王海云

张致一 校

责任编辑 吴爱珍

科学出版社出版

北京朝阳门内大街137号

中国科学院科技印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

1988年8月第一版 开本：787×1092 1/16

1988年8月第一次印刷 印张：26 1/2

印数：0001—1,850 字数：618,000

ISBN 7-03-000056-0/R·2

定价：9.20元

译 序

本书是美国得克萨斯医学中心贝勒 (Baylor) 医学院细胞生物系主任奥马利 (B. W. O'Malley) 和系副主任施拉德 (W. T. Schrader) 主编的一部实验讲义。奥马利教授多年来在激素受体和激素对基因表达的调节控制方面做过许多出色的工作。

每年春天, 贝勒医学院都要在休斯敦市组织为期半月的讲习班, 介绍激素的作用与分子内分泌学的研究方法和研究进展。参加者有来自世界各地的研究人员百余人, 加上旁听者, 达数百人。讲习班已坚持了十余年。

这本实验方法手册就是为讲习班准备的教材, 共有十四章, 本书是根据第六版 (1982年) 翻译的。

本书对从事激素生化、临床医学和分子生物学研究的科研人员、研究生和大学生都不失为一部较好的工具书, 故乐于译出, 献给同行们。

译者于中国科学院动物研究所内分泌研究室

北京, 1985年1月

目 录

译序

第一章	类固醇激素受体：基本原理和测定	(1)
第二章	类固醇激素受体的纯化及其特性	(33)
第三章	质膜受体：研究方法的选择和标准	(68)
第四章	信使核糖核酸 (mRNA) 的分离、鉴定和杂交分析	(86)
第五章	真核细胞基因的作图与克隆	(132)
第六章	DNA的复制与修复	(169)
第七章	细胞核与染色质：分离、特性及结构	(181)
第八章	信使核糖核酸的翻译和蛋白质合成	(217)
第九章	环核苷酸研究技术	(244)
第十章	cAMP和钙依赖性蛋白激酶	(271)
第十一章	钙调蛋白 (calmodulin) 与环核苷酸磷酸二酯酶	(295)
第十二章	微管蛋白抗体：免疫、纯化和间接免疫荧光实践指南	(312)
第十三章	真核细胞基因的表达：转录与分析	(327)
第十四章	组织培养技术	(349)
参考文献		(374)

第一章 类固醇激素受体：基本原理和测定

James H. Clark和Ernest J. Peck Jr.

I. 前言	C. 混合结合体系的分析
A. 在血液中的结合、代谢及组织的相互作用	D. 受体浓度极大地超过反应解离常数时对受体的测定
B. 类固醇激素在细胞内的积聚及在细胞质中的结合	E. 类固醇结合的特异性
II. 受体的标准	F. Scatchard作图中的弯钩和曲线
A. 有限的结合容量	IV. 受体的状态及 ³ H类固醇交换法
B. 高亲和力	A. 交换技术的理论和实际
C. 类固醇特异性	B. 类固醇交换的时间和温度
D. 组织特异性	C. 受体部位结合状态的测定
E. 与生物学反应的相关性	V. 受体分析的方法
III. 受体的参数：理论和实际	A. 细胞质受体
A. 非特异结合高时对受体的测定	B. 核受体
B. 用Scatchard分析说明饱和结合参数	

I. 前言

类固醇性激素经血流而运输到身体各个部分，但这些化合物只对某些组织和器官有刺激作用。对于较早从事药物和激素作用的学者来说，这种简单的事实表明，对一种特定的激素有反应的那些器官，必定含有识别部位或受体。已知激素是在很低浓度时起作用的，即 10^{-10} — 10^{-8} mol/L。为了能察觉出这些非常少量的类固醇，推测受体必定对这些化合物有高亲和力。以前研究类固醇激素的受体是受限制的，因为当时还没有高比活的放射性类固醇。Jensen及其合作者（Jensen和Jacobson, 1962）合成了高比活性的³H雌二醇，这对激素作用的研究是一重要贡献之后，人们就有可能观察³H雌二醇在子宫、阴道、垂体及其它靶器官中的积聚和贮留的差异（Jensen和Jacobson, 1962; Noteboom和Gorski, 1965; King和Mainwaring, 1974）。从那时起，对所有类固醇激素都观察到类固醇-靶器官之间有相同的相互作用（interaction）。本章将介绍这些受体类固醇激素的相互作用。对

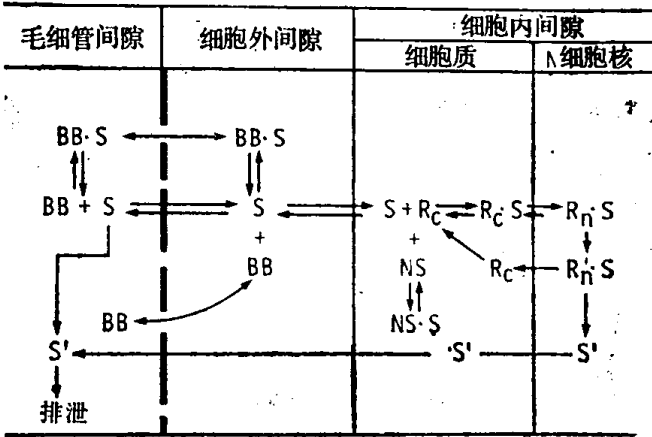


图1 生物体内不同组分中类固醇与蛋白质的相互作用图解。
BB, 血液中的结合体, Rc, 细胞质受体, Rn, 核受体, NS, 非特异结合, S, 类固醇。

此，有一图解（见图1）可作为了解本章有关概念和专有名词的指导。

A. 在血液中的结合、代谢及与组织的相互作用

性类固醇与细胞内受体的相互作用与可以进入靶细胞的游离激素的量有关。这种参数作为几种变量的函数而有所变动，可见图1和以下各节的叙述。

1. 类固醇在血液中的结合

性类固醇与血液中许多大分子结合（图1的BB）。这些血液中的结合体与类固醇的亲合力从很弱（ $K_d = 10^{-3} \text{mol/L}$ ）到很强（ $K_d = 10^{-10} - 10^{-8} \text{mol/L}$ ），而且它们通常都以高浓度而存在于血液中（Murphy, 1968; Soloff等, 1971）。所以，这些蛋白质能够限制用于受体结合的游离激素的量，并且可能对类固醇激素作用的调控有重要意义。单纯测量血液中总类固醇激素的浓度有可能导致对靶组织中激素刺激作用的水平作出错误的结论。例如血液中的结合蛋白有睾酮雌激素结合球蛋白（TEBG）和甲胎蛋白（ α -FP），它们可以与睾酮和雌二醇结合，亲合力高（ $K_d = 10^{-10} \text{mol/L}$ ）。大鼠新生时和发情前期，FP逐渐下降，新生时，从很高浓度降到发情期刚过时的很低浓度（Pamond, 1973）。所以在FP浓度逐渐降低时，游离的性类固醇会逐渐增加。按照这种方式，增加了浓度的类固醇即可用于与细胞发生相互作用。

与性类固醇激素没有特异结合的结合体，在类固醇激素的生理作用中可能也是有意义的。血清白蛋白，是血管和细胞外间隙中的一种成分，它与雌激素的亲合力比较弱（ $K_d = 10^{-4} - 10^{-5} \text{mol/L}$ ），但却是一种很重要的雌激素结合体。清蛋白在血液中的浓度为4%（ $7 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ ）。在此浓度时，清蛋白可以改变细胞内类固醇的平衡分布，因此，对于类固醇作用的相对效能是很重要的。例如，在4℃时，雌二醇（ E_2 ）和雌三醇（ E_3 ）与雌激素受体的复合物的 K_d 值分别为 10^{-10} 和 10^{-9}mol/L 。所以 E_2 的作用效能应比 E_3 大10倍。但是，已有证据表明，这两种激素早期的促子宫作用，即水的渗润作用、RNA和蛋白质的合成等的效能相同，这些现象是在注射激素后1—6小时之内产生的（Anderson等, 1972, 1975; Hardin等, 1976）。在预测的和实际观察到的效能之间的不一致现象，是由于这些类固醇与血浆组分的结合能力不同所造成的。血浆结合体如清蛋白，与 E_2 的亲合力比 E_3 要大10—100倍。所以，如果注射这两种类固醇时，游离的和可供与组织相互作用的 E_3 就会比 E_2 的量大得多。这种增多的 E_3 水平就造成与 E_2 有大约相等的受体结合和相等的早期促子宫作用的刺激效能（Anderson等, 1975; Hardin等, 1976）。

此外，在靶组织中清蛋白的量在激素影响下会发生变化。雌二醇可使子宫中清蛋白的积聚和贮留增加，但对腰肌、肝或脑等非靶组织的清蛋白则无影响（Peterson和Spaziani, 1971）。上述清蛋白（可能还有与清蛋白结合的雌激素）的积聚和贮留，可能与子宫内雌激素总量的水平形成有关。子宫内雌激素总量的水平要大于体循环的雌激素总量的水平，并可能在较长时间维持较高水平。

2. 代谢及类固醇与组织的相互作用

存在于体内并用于受体结合类固醇的量,不仅依赖于与血液中结合体的相互关系,而且也依赖这种激素(图1中的SS¹)的代谢和排泄的速率。代谢清除率(MCR),或是从体内移去外源给予的激素在单位时间内所需要的血液体积,这对于考虑生物活性是很重要的。快速的MCR会减少这种激素与其受体接触的时间,而慢MCR则会增加接触时间。这些因素在预测或分析每一种激素的生物学效应时,都必须考虑到。

雌激素和孕酮的生物活性不依赖代谢的转化(Jensen和Jacobson, 1962; Schrader等, 1972)。这就是说,在类固醇进入细胞后,一旦受体类固醇复合物形成,这些复合物就有功能活性。但是,如果假设在所有情况下代谢都并不重要,则必须采取谨慎态度,因为已经证明在某些雄性副性器官中,雄激素的作用需要睾酮转化为二氢睾酮(Anderson和Liao, 1968; Bruchovsky和Wilson, 1968)。

此外,代谢对于类固醇从靶组织中的消除可能是重要的。Gurpide和Welch(1969)曾证明,雌二醇和雌酮在人子宫内膜中的相互转化是很频繁的,雌二醇从组织中释放出来之前代谢为雌酮(也见Stolee和Tseng, 1971; King和Mainwaring, 1974; Clark和Peck, 1976综述)。

B. 类固醇激素在细胞内的积聚及在细胞质中的结合

1. 细胞对类固醇的摄取

类固醇从细胞外间隙向细胞内的进入似乎是经过扩散作用而产生的(图1)。直到最近,研究类固醇激素的摄取都还是包括利用在体内和体外的条件,将靶组织和非靶组织与标记的类固醇接触足够长的时间(Gorski等, 1968; Jensen和Jacobson, 1962)。这些研究都指出,类固醇的摄取中含有一可饱和的成分,它准确地反映了类固醇与受体相互作用以后的贮留,而并不能说明类固醇进入细胞的速度。Gurpide和他的合作者(Gurpide和Welch, 1969)用双标记同位素在稳定状态下的灌注技术,曾表明有几种类固醇进入靶组织和非靶组织同样快(0.2—5000ng/ml范围内),其速率与类固醇的浓度成正比。尽管这些结果并不否定有一载体调节过程的可能性,但用简单的扩散作用来说明则是最容易解释的。为了试图鉴别进入和贮留,Peck等(1973)用体外实验研究了在起始速度和平衡条件下子宫对³H雌二醇的摄取。这些研究表明:(a) Rc(胞液受体)不参与雌二醇进入子宫组织;(b)雌二醇的进入不依赖于代谢能;(c)³H雌二醇的进入不被具有雌激素性质的试剂如己烯雌酚(DES)所抑制。这些研究支持以往的看法,即雌二醇在介质和组织(靶或非靶的)之间的分布最初是非特异性的和被动的形式。

2. 受体和类固醇在细胞质中的结合

在进入靶细胞之后,类固醇或是与细胞质受体(R_c)结合,形成受体类固醇复合物(R_cS),或是与在细胞质中的各种低亲和力结合部位结合(NS),如图1所示。在平衡条件下,细胞内的类固醇的贮留包括两种结合部位:一种是数目有限的、具有高亲和力及明显特异性的部位;第二种是低亲和力但是大容量的部位。对这两种类型的结合部位的区分必须小心地进行测定,方法见第三节。

3. 从细胞质到细胞核的移位

R_c 复合物能从靶细胞的细胞质移入核内(图1, R_cS , R_nS)。这个结论来自Jensen等(1968)和Shyamala与Gorski(1969), 他们证明随着结合的激素在细胞核内的积聚, 细胞质受体相应减少。上述现象在时间上和化学计量之间有相关性, 并且与从细胞质到细胞核的移位概念是一致的(Ancerson等, 1972; Clark等, 1976)。

从细胞质到细胞核的移位概念的进一步证实是来自 R_cE 和 R_nE 复合物具有相同的解离常数和激素特异性(Puca和Bresciani, 1968), 以及在变性条件下的沉降系数(Stancel等, 1973)。移位过程的出现与动情周期血液中雌激素的波动水平有相关性(Clark等, 1972)。这些观察以及Williams和Gorski(1974)有关温度动力学的结果表明, R_nS 复合物是由 R_cS 复合物经过移位过程而衍生的。

4. 受体类固醇复合物在核内的积聚和贮留

R_nS 复合物的贮留是雌激素诱导子宫生长过程中的一种重要的功能。具有雌激素作用的化合物可以造成 R_nE 复合物在核内的积聚, 但如不能使贮留超过6小时或更长的时间, 则不能导致真正的子宫生长。所以不仅要测定 R_nE 复合物的积聚, 还必须估价贮留时间。核贮留时间和子宫生长反应的关系还要在第V节B叙述。

II、受体的标准

下列标准表示在仅含一种受体部位的简单体系和含有多种受体部位的较复杂的体系。

A. 有限的结合容量

对于一种类固醇激素的生物学反应是一种可饱和的现象。如果受体类固醇复合物的形成对于一种生物学反应的产生是必需的, 那么类固醇受体的量应该是有限度的, 所以结合部位也是有一定数目的。这项标准, 有限的结合容量, 应该经过所研究的受体结合部位能被它的特异性配体所饱和而得到证明。这通常是将受体源(一种靶组织的胞液和核组分)与不同浓度的 3H 类固醇接触, 并使类固醇与受体的结合达到平衡而完成的。然后测定结合的 3H 雌二醇的量。用此方法所得数据在本章后面将加以讨论。作为例子和基于原理上的考虑, 图2表示出 3H 雌激素与大鼠子宫胞液的典型结合曲线。

图2中标出“总的”字样的曲线代表 3H 类固醇与特异受体部位和非特异的结合部位, 因此反映可饱和与不可饱和的组分。可饱和的或受体的组分由总的和非特异的结合之间的算术差异来确定。非特异的或不可饱和的结合, 是在存在过量非标记竞争性配体(例如己烯雌酚)时测量 3H 类固醇的结合即可得到(见图2)。在本章后面将会讨论确定这种过量的摩尔所需要的参数。在这些条件下, 非标记的类固醇主要占据所有高亲和的结合部位, 但不改变 3H 类固醇与低亲和的、非特异的或不可饱和部位的结合。这种方法假设非特异结合部位与受体系统相比是低亲和的、高容量的。在子宫、垂体、下

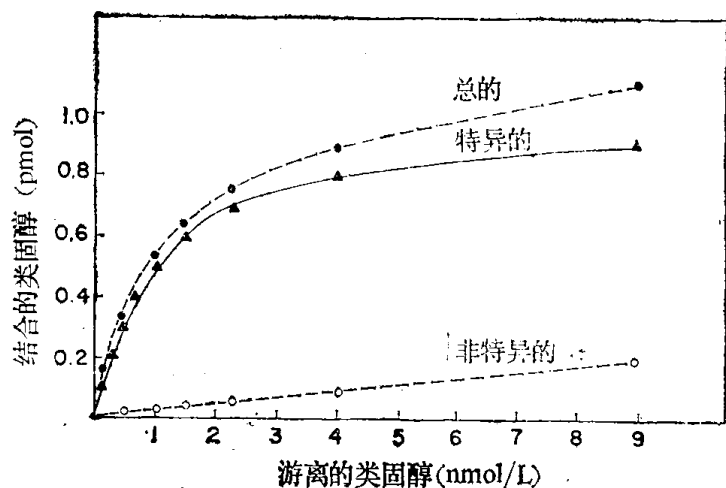


图2 类固醇结合的特异和非特异结合部位。
结合的类固醇 (▲) 经总结合 (•) 减去非特异结合 (○) 而确定。

丘脑的雌激素受体中的确是这种情况。但是对任何一种受体体系来说,这种假设均应经过如图2所示非特异结合的直线或Scatchard作图(见下面)的证实而确认。用这种方法可以确定受体的结合部位,即特异结合,如图2所示,可经总结合减去非特异的或不可饱和的结合得来。计算出来的特异结合的数值用来确定结合部位的总数(n)和受体类固醇复合物(RS)的解离常数(K_d),这是对于R与S的亲 和力的测量。图3表明分析这些数据的两种方法。在图3A中,是Scatchard方法,而图3B是双倒数作图法。高亲和的结合部位数目, n (B_{max} 或 R_t) 在图3A中,由X轴的截距得出,图3B中则由Y轴的截距的倒数得出。解离常数的求得如下所述。

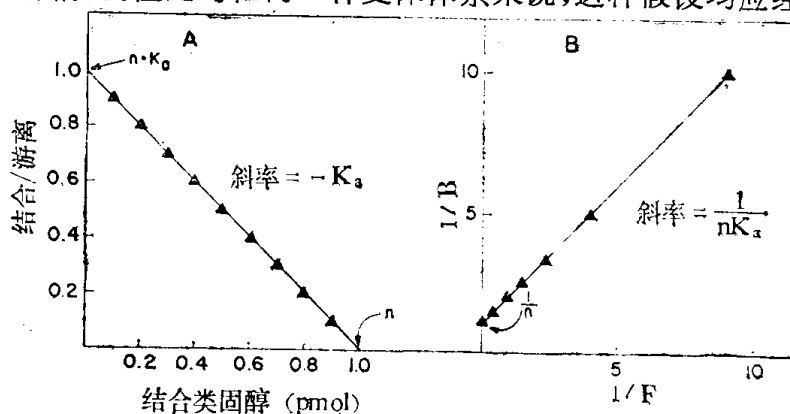


图3 受体结合参数的测定。图1的特异结合用于绘制(A) Scatchard作图或(B) 双倒数图。

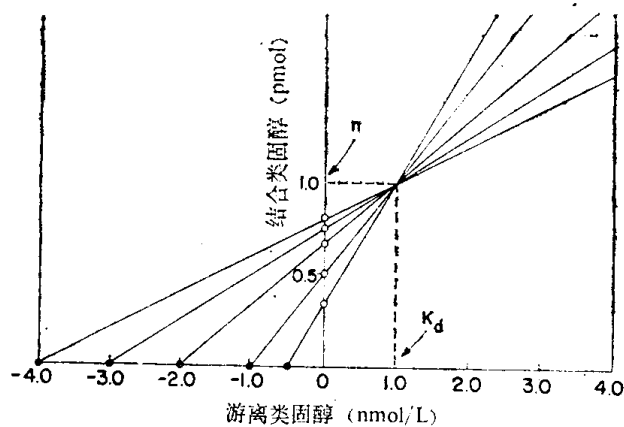


图4 直接直线作图测定受体参数。直线经特异结合类固醇(▲)和每一个游离类固醇(•)的负值绘出。这些条直线的相交点可给出结合部位的数目(N)和解离常数(K_d)。

还有一种改良的方法可确定受体部位的数目,叫做直接直线作图法(图4)。这种方法最初是Eisenthal和Cornish-Bowden (1974) 为分析酶动力学而建立的,近来被用于测定类固醇受体的结合参数 (Woosley和Muldoon, 1976; Walters和Clark, 1977b)。其过程是一简单的图解方法,在统计学上是可靠的,并且

不需要计算 (Cornish-Bowden 和 Eisenthal, 1974)。用此方法 n 和 K_d 可直接从一系列标出 (-1) (游离类固醇浓度) 符号的数值和在每一浓度时所结合类固醇浓度连成直线的相交点得出 (见图 4)。

B. 高 亲 和 力

类固醇的受体应对其相应的激素有高的亲和力。这是可以想像到的, 因为血液循环中类固醇的水平通常为 10^{-10} — 10^{-8} mol/L。因而, 有重要生理作用的、由受体所调节的存在的反应, 就要求受体与在血液水平的范围之内的激素有亲和力; 否则, 反应即不出现。这些考虑已由各种靶组织受体的研究结果所证实; 但这也不排除当血液或组织中类固醇或受体有所增加时受体的相互作用亲和力较弱。

亲和力或结合常数 (K_s), 或其倒数, 即解离常数 (K_d), 是由图 3 或 4 的分析得到的。Scatchard 作图的 Y 截距, 如图 3A 所示, 等于 nk_s 或 n/k_d ; 而双倒数作图中的 X 截距, 如图 3B 所示, 等于 $-K_s$ 或 $-1/K_d$ 。图 4 表示 K_d 可以从各直线交点直接外推而求出。虽然有些研究者假设一种受体对于一种类固醇的相对亲和力, 可以测定类固醇产生一种反应的效能, 但实际上不一定是如此。有很多因素决定着激素作用的最终表达, 这将在本书中进行讨论。

C. 类 固 醇 特 异 性

一般说来, 受体应对于一种特异的激素或一类激素有高亲和力。这种“特异性”可以使某种靶细胞对于一种激素的信号起反应, 并且不受其它信号的干扰。因此, 同一类的激素或其激动剂和拮抗剂应能有效地竞争某一类受体而不影响另外的受体系统。上述特异结合部位的测定就是应用这种原理 (见图 2 和 3)。过量的 DES (为雌激素的激动剂, 具有与雌二醇相同的亲和力而与受体结合) 基本上可以阻止全部的 3H 雌二醇与受体的结合。另一方面, 非雌激素作用的类固醇, 在适量浓度时应该不竞争雌激素受体, 也就是说, 它们应该对图 2 中观察到的总结合有极小的或甚至没有影响。图 5 是分析雌激素受体特异性的典型数据。DES 非常有效地减少了 3H 雌二醇与子宫核组分结合的量, 而孕酮和睾酮甚至在很高浓度时也无此作用。

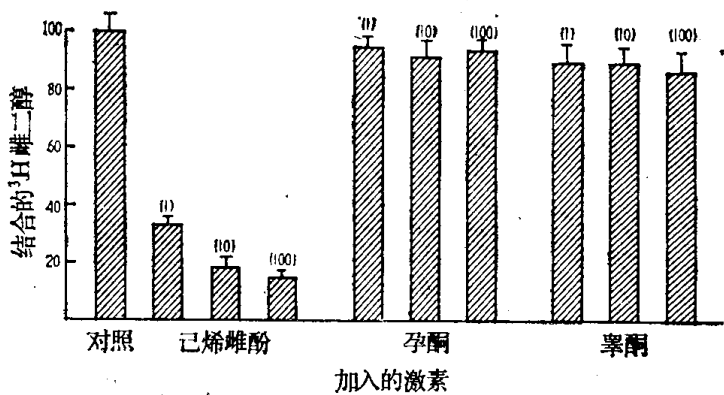


图 5 雌激素受体的特异结合。不同激素对大鼠子宫核组分 3H 雌二醇交换的影响。给大鼠注射 $2.5\mu g$, 1 小时以后制备子宫核组分。非标记激素与 1.3×10^{-8} mol/L 3H 雌二醇混匀。未加不标记配体时 3H 雌二醇的结合作为 100% 总结合。

不同类固醇的结构能力有限。雌激素受体对所有类固醇都有些亲和力, 如近来发现的雄激

素对雌激素的亲合力。体外实验表明,非常高浓度的雄激素(3—10mg在体内; 1—10 μ mol/L在体外)能够促进子宫雌激素受体从细胞质到细胞核的移位,以及刺激蛋白质和所谓的诱导蛋白(IP)的合成。在此条件下,睾酮也与在子宫内存在的雄激素受体结合。这种受体与雌激素受体有区别,并且不参与雌激素的刺激作用。Korach和Muldoon也证明雄激素可以与雌激素受体部位相互作用。在类固醇结合的平衡和动力学研究中,以上作者证明,超过量很大的(1,000倍)非标记雄激素对高亲和的雌激素受体部位有竞争性阻断能力,并且降低雌激素与此部位的结合速度。上面所讨论的作用的生理意义似乎是值得怀疑的,因为在体内能产生上述作用需要微克分子浓度的游离雄激素,而雄性或雌性个体在正常环境中很难达到这么高的浓度。

孕酮与其受体的结合似乎比雌激素的特异性要低。孕酮与雄激素和糖皮质激素受体均有结合;此外,糖皮质激素已知与孕酮受体结合。因此孕酮受体的测量在竞争结合分析中要特别注意(见本章V-B节)。

D. 组 织 特 异 性

仅有少数组织和器官能接受性类固醇激素的刺激。它们叫做靶器官,即子宫、阴道、乳腺等。一般认为,如果这些靶器官的反应是由受体相互作用造成,则在靶器官中受体的数目应高于非靶器官。虽然现在还没有确定对靶细胞下定义所需要的最低的受体数目,但组织特异性应是确认受体存在论证中的一个部分。典型的数据可见表1,由此可看出在子宫、阴道和垂体中细胞质雌激素受体的数目很高,而在其它组织中虽然也存在受体,但数目很低。下丘脑由于在解剖学区域内细胞类型的不均一性,致使受体浓度低。并非所有下丘脑的细胞都是雌激素的靶细胞,但是凡有雌激素反应的细胞受体数目则大约与其它靶细胞相等。在每一细胞中受体少于一个的情况下,应认为这并不是靶组织,或者这种靶组织比一般组织有更多的限制性。

表1 雌激素受体在靶或非靶组织中的含量

组 织		受体含量 (pmol/100mg湿重)
子	宫	5.92
阴	道	2.15
垂	体	1.43
下	丘 脑	0.5—0.10
	肾	0.2
横	膈 膜	0.06
	脾	0.02

E. 与生物学反应的相关性

在所有关于结合类固醇并符合上述标准的大分子的研究中,无疑都承认这种结合会

产生生物学反应。那么，激素与假定的受体的结合应先于或伴随组织的反应。同时，反应的程度应该与已占据的受体的一些功能有关。这种标准，即表明受体依赖性的激素的反应，并不是经常具备的，而且是最难证实的。在某些体系中，例如假雌雄同体的雄小鼠，已证实在没有细胞质受体时不能对激素产生反应。这些动物对雄激素缺乏反应，这种不敏感性与雄激素受体的缺乏是有关系的 (Bullock 等, 1971; Gehring 等, 1971; Milin和Roy, 1973)。Sibley和Tomkins (1974) 曾证实淋巴细胞的类固醇抗性可能是由多种受体功能的缺陷所造成的：

- (a) 细胞质受体 (R_c) 减少或改变，致使受体类固醇复合物 (RS) 不能形成；
- (b) 复合物可以形成但不能移位；
- (c) 复合物可以形成并移位但不能刺激核的反应。

此外，已经知道子宫在 R_c 低时对雌激素不起反应，而当 R_c 增加时即可恢复正常的反应 (Clark 等, 1973a)。这种标准在下面还要详细讨论。

Ⅲ、受体的参数：理论和实际

前面讨论的受体亲和力和容量，是根据含有较高水平的一种特异的单一系统的类固醇结合部位所得到的数据。虽然有时是这样，但在大多数情况下，往往并非如此。本节拟介绍一些经常遇到的问题，并提供一些解决办法。

A. 非特异结合高时对受体的测定

在理想的条件下，饱和分析应如图 2 所示，这样的受体部位的结合容量与亲和力可以按照图 3 确切地计算出来。但在很多激素受体系统中，在总结合中非特异结合 (NS) 的量很大 (图 6 A)，则对特异结合 (总结合与非特异结合之差) 准确测定的可能性就很小。在有或无竞争性配体时，仔细地进行饱和分析对测定这种情况下的受体部位是很重要的。要证明有限数目的特异受体部位并对某种激素的配体结合具有特异性，就应通过

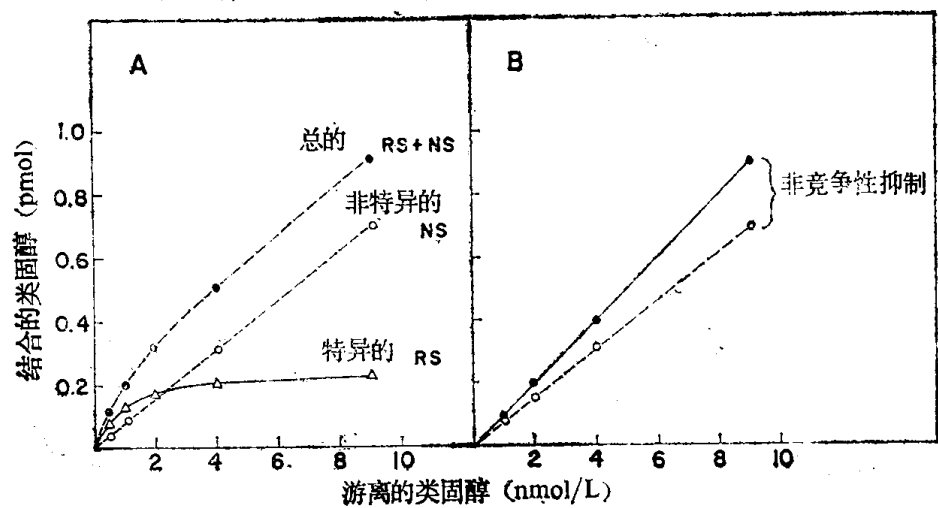


图 6 在竞争 (A) 和非竞争 (B) 抑制条件下饱和与不饱和类固醇结合的比较。

受体的可饱和特性而不能用“一点法”分析（见下面）。

由非竞争性的原理而出现配基结合的抑制，可产生明显的受体配体相互作用的“特异性抑制”。如果存在这种情况，可能的结果是NS（非特异结合）和NS + RS（总结合S）两者都呈直线，如图6B所示。如图“一点法”分析[即只用一种浓度的标记配体（ $10K_d$ 值）加和减过量的不标记配体]，即会导致错误的结果。根据受体部位的组织来源和每单位组织中的受体数目，研究者可能不得不使用“一点法”来研究在改变生理情况过程中受体的动态变化。不过，对这样一种分析系统所研究的受体的可饱和性质方面，一定要经过特性鉴定；此外，如发生任何异常的受体数目（尤其是有特别多的受体）时，仍必须经Scatchard分析来证实。

B. 用Scatchard分析说明饱和和结合参数

还有不少作者讨论了许多Scatchard分析中的问题（Rodbard, 1973; Williams和Gorski, 1974; Chamness和McGuire, 1975; Buller等, 1976）。在他们的说明中，有几点是非常重要的，因此我们愿在此节予以讨论。

1. 在有非特异结合时对受体数目的测定

图7表明含有一种可饱和受体体系（R）和一种不可饱和的、非特异结合体系（NS）的典型数据。RS、NS和两者之和是用Scatchard方法分析的。在很多情况下，NS并未测定；即用RS + NS图在横坐标上外推确定一点为n值，以此为该系统中的受体数目。这样分析常常会超过真正的n值。n的精确测定或者可以用竞争法测非特异结合，用非线性曲线配合程序进行参数分析，或是用Rosenthal(1967)和Feldman (1972)描述过的相关绘图方法分析。这将在本章后面详细讨论。

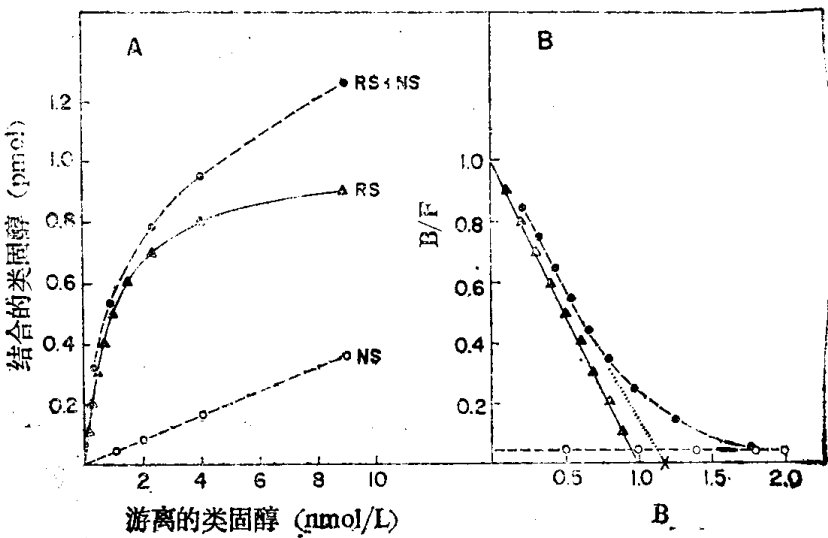


图7 (A)存在非特异结合时受体组分的(A)饱和的和(B)Scatchard分析从总结合(•)减去非特异结合(○)确定特异结合(▲)。虚线和在横坐标上的×代表结合部位未经校正的外推。详见文中所述。

2. 具有不同亲和力的两种特异结合部位

在很多受体体系中，两种或更多的结合蛋白对同一种类固醇具有相同的高亲和力。

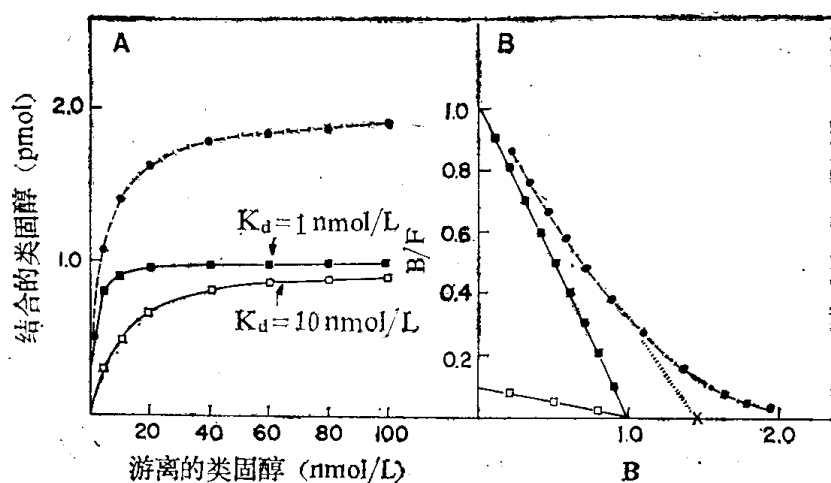


图8 具有相同数量但不同亲和力的两个特异结合部位的饱和(A)和Scatchard(B)分析。总特异结合(●); 来自每一个部位的特异结合(■□)。

产生对结合部位数目的不恰当的估计(见图8B)。此外,还会造成错误结论,即只有一个特异的结合组分。当低亲和($K_d = 10^{-8} \text{ mol/L}$)的结合组分大大超过高亲和组分

这种条件可以产生如图8所示的理论上的情况。在此例中,为了方便起见,曾将非特异结合成分消除,后面将讨论这个问题。结合部位的混合所产生的饱和曲线(图8A)并不表现有两个结合组分,但在Scatchard分析(图8B)中则明显地存在两个组分。要注意在通常的饱和分析中可能只包括低浓度范围的类固醇,那么,明显直线的外推就会

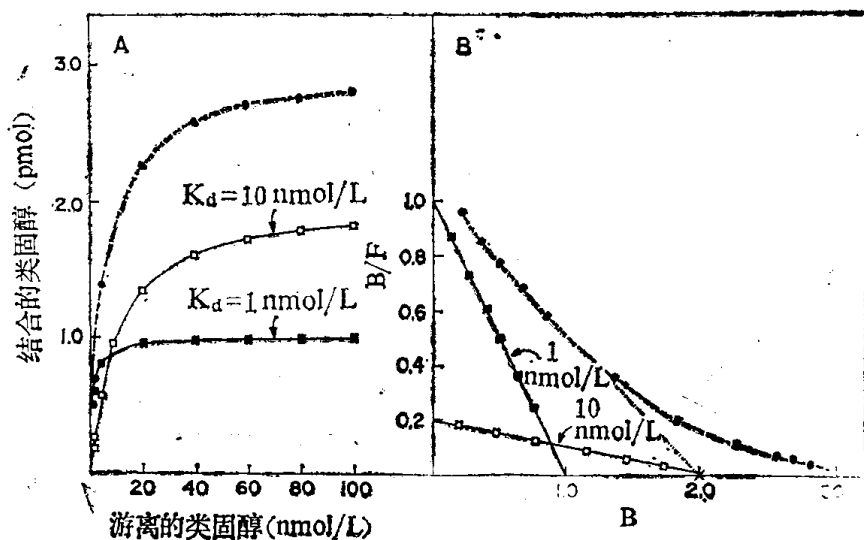


图9 不同数量和亲和力的两个特异结合部位的饱和(A)和Scatchard(B)分析。符号与图7相同。

时,这种类型的误差就会更大(图9),在这种情况下,类固醇低浓度时的结合分析,会导至对单一结合部位的总数目估计过高,而对其与类固醇的亲和力则估计过低。

若包括非特异结合组分(它往往会存在)则进一步使分析复杂化。图10表示非特异结合存在于两个特异结合部位的情况。饱和曲线(图10A)也显示不出含有潜在的3个同样体系(图10B)。Scatchard分析已校正过的非特异结合数据表明存在两个或更多的结合组分。在这种情况下,忽视了复杂体系的存在,而将看上去的直线外推,就会得到 K_a 为 0.4 mol/L ,结合部位浓度为 2.5 pmol/ml 的单一结合部位。不仔细测定复杂结合体系能导致受体参数测定的很大误差。引用此例是要说明各种结合部位的药理上的(竞争性配体)差别和物理上的区分的必要性,以便对全部组分都进行精确的测定。

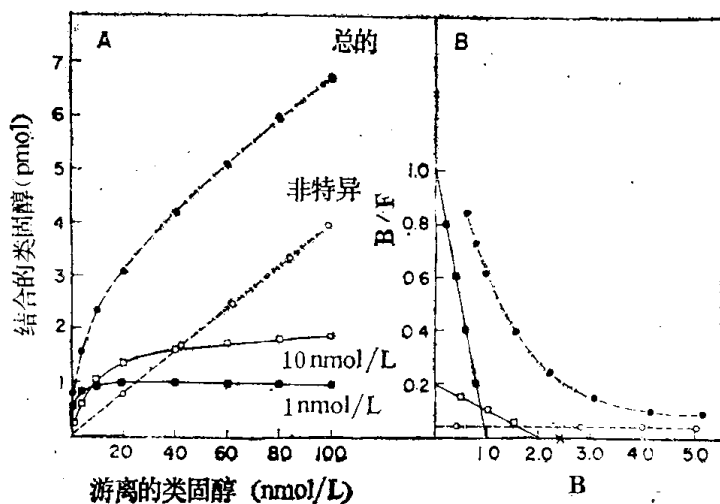


图10 (A) 饱和与 (B) Scatchard分析。在有非特异结合时数量和亲和力不相同的两种特异部位。符号与图7和8相同。

C. 混合结合体系的分析

1. 曲线Scatchard作图的图解分析

显而易见的和理想的解决上述混合结合体系问题的方法是，物理方法分离和纯化不同的组分，以便对每一种分离出的体系进行研究。但这并不容易，因为组织量是有限的。Rosenthal (1967) 和Feldman (1972) 曾提出解决多种结合组分用曲线 Scatchard作图的图解分析。近来Munck (1976) 对此作过综述。简单说来，是从曲线的 Scatchard作图，再经过点与点的总和成矢量方式，找出直线再复制出原始的曲线。过程见图11。注意矢量必须由两个独立的组分总和而确定。Munck (1976) 做过更完全的综述。通常数据是有限的，而在超过两种组分时，精确的曲线是不容易确定的。

这种复杂的Scatchard图常常要求研究者用一些复杂的过程去分析在体系中存在的多种组分。这些过程可包括使用价廉的尺子（例如前面讨论过的矢量分析）或是一种非常高级的计算机。在最简单的情况下，体系中包含一种特异的或可饱和的组分和一种不可饱和的组分（如图7）。在大多数情况下，非特异结合直接与游离配体的浓度成正比，所以在 Scatchard图上，NS与S之比在高亲和的受体组分被饱和以后，就保持不变（见图7；也可见于Davies 和 Ryan, 1973; Chamness和McGuire, 1975）。对此简单体系的分析可以用Rosenthal (1967) 的图解方法；也可用Chamness和McGuire (1975) 所介绍的一种

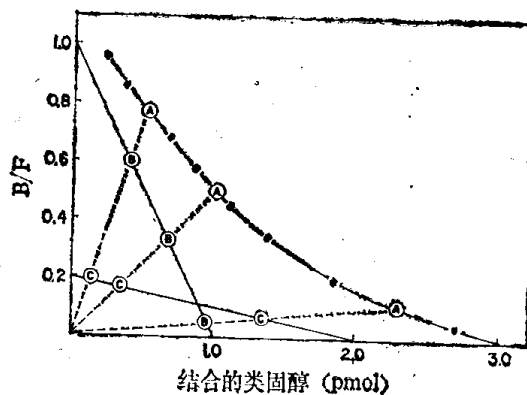


图11 两种结合组分的曲线Scatchard图的矢量分析。Scatchard图的每个A点是每个结合组分的B和C点之和。两个直线组分经调整其斜率使全部直线从原点(O)到Scatchard图上都是OC + OB = A时即可求出。

改良方法，或是用Hart (1965) 的代数法。另外，竞争配体法(如图 2 所示) 也可用来测定这种组分。

在复杂的体系中，对于包括两种或更多的可饱和组分，研究者必须依赖物理的或药理的技术区分不同的结合部位，或者必须借助计算机的复杂的过程，如非线性曲线配合的程序 (Rosenthal 1967; Rodbard, 1973) 或者用Feldman (1972), Priore和Rosenthal (1976) 的统计参数配合的过程来解决。

2. 有区别的配体特异性

如果能够得到非常完全和详细的配体结合数据，则应用几何的或参数过程的分析方法是很有用的。但由于生物材料的限制，往往不能做到，所以必须寻找其它方法以便克服这种困难。配体结合的，有区别的抑制 (竞争法) 曾有效地用于测量混合体系中的已知组分。例如，图10中有三种组分的体系，血清蛋白的 K_d 值为 10^{-8} mol/L，它与雌二醇和睾酮有同样的结合，即类固醇结合球蛋白，人在妊娠期此蛋白质增多。雌激素受体

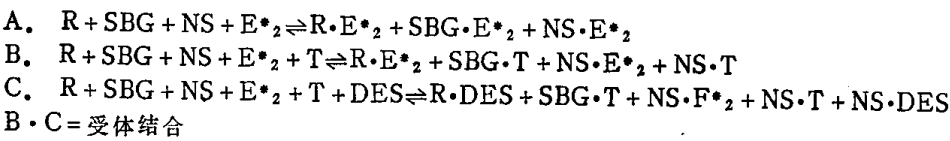


图12 在有类固醇结合球蛋白时的受体测定。R (受体)；SBG (类固醇结合球蛋白)；NS (非特异结合)； E_2 (3H 雌二醇)；T (睾酮)；DES (己烯雌酚)。

(R) 的 K_d 值可能为 10^{-9} mol/L，而非特异结合 (NS)可能来自大量的蛋白质和脂类。在这种条件下，由于SBG和R有区别的结合特异性而可以测定配体与受体的结合。睾酮与SBG和R的相对结合依赖于睾酮与它们各自的相对亲和力 (对此以后还要讨论)。这一体系见图12。用标记的雌二醇，同时有非标记睾酮或加己烯雌酚，研究者可以测定总结合 ($R + SBG + NS$)，雌二醇的特异和非特异结合 ($R + NS$) 以及雌二醇单独的非特异结合 (NS)。A表示 3H 雌二醇与所有三种组分的结合，B和C表示标记雌二醇与SBG和R的结合分别由睾酮和DES顶替。经过相减，就可以计算出在此体系中含有三种组分，而且对每一种都要有足够的了解。这就是说，要解释这种结合体系的药理学，即各种结合组分在几种配体的浓度下所显示的配体结合特异性的程度。有了对上述情况的了解和结合部位对改变pH、温度或物理处理等不同的敏感性方面的知识，就有可能分析受体部位复杂的混合情况。

同样道理也可用于分析甲胎蛋白 (α -FP) 存在时雌激素与受体的结合。 α -FP在新生大鼠含量很高，并与雌二醇有高亲和力 ($K_d 10^{-10}$ mol/L)，接近于受体的 K_d 。利用

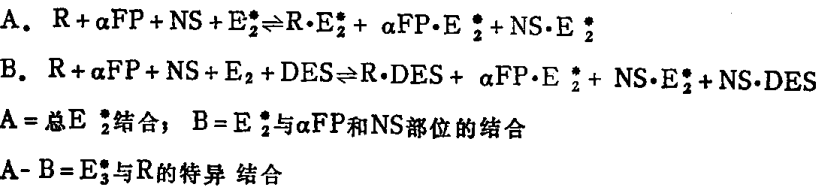


图13 有甲胎蛋白时受体结合的测定。R (受体)；FP (甲胎蛋白)；NS (非特异结合)； E_2 (3H 雌二醇)；DES (己烯雌酚)。

DES与 α -FP有低亲和力而能很有效地与雌二醇竞争雌激素受体结合部位的事实 (Sol off等, 1971), 就可以测定雌激素的受体。可见图13。A表示雌二醇与R, FP和NS的结合, B代表DES与R和NS的结合。标记的雌二醇与R的结合可以由A-B求得。不同配体的特异性曾被有些研究者用于分析混合结合体系。

3. 饱和分析和相对亲和力

前面讨论了有区别的类型固醇特异结合组分混合体系的例子。还可以在具有类型固醇混合体系中合理地测定单个结合组分, 如果它们对类型固醇的亲和力有显著差异的话图14表示两种结合组分, R和R', 解离常数分别为 1×10^{-9} 和 50×10^{-9} mol/L。从这两种受体的饱和曲线可看出, 在饱和情况下, 100nmol/L (图14B点) 要测量R, 就会导致检出很多数量的 R'。但是, 如果在 5 - 10nmol/L, 接近R的饱和浓度, 就会测到约90%的R部位和 10—20%的 R' 部位 (图14A点)。用这种方法可完全把两种 K_d 值相差100倍的受体部位分开。应注意这样的分析意味着要对所用体系的饱和特性和动力学性质有一详尽的研究。此外, 很显然, 这种分析在R' 超过R太多时是不能进行的。

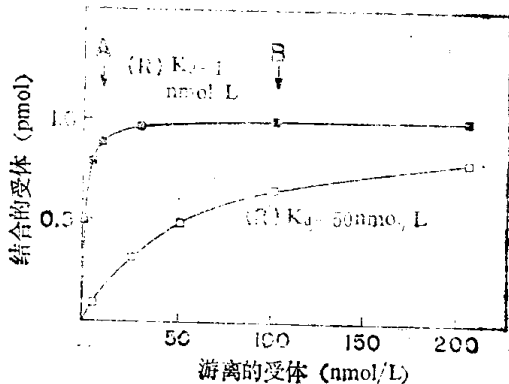


图14 在有低亲和力的特异结合组分时对高亲和力特异结合组分的测定。

4. 子宫内雌激素结合部位的不均一性

图15表明一种特殊的例子, 即子宫胞液中存在的初级和次级雌二醇结合部位。虽然此曲线似乎只包括一种结合部位, 但的确是由两种组分组成的, 并且可以用前面述及的

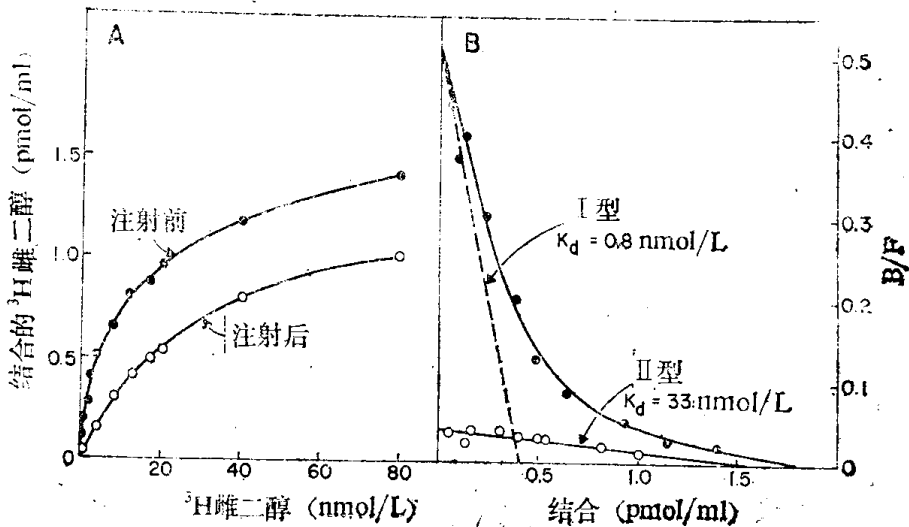


图15 雌激素在大鼠子宫中的结合。

- A. 饱和分析: 不注射的 (•) 或在杀死前60分钟注射雌二醇2.5 μ g的大鼠子宫胞液中可被过量DES顶替的 3 H雌二醇结合的量 (特异结合)。
- B. A图数据的Scatchard分析: 雌激素处理过的动物子宫胞液 3 H雌二醇结合的量 (O - I型) 被总结合 (•) 减去之后得到虚线 I 型