

用异源放射免疫分析法 测定猪血清促黄体素(LH)

张志铭 仲跻峰 孙拓安 民董伟

(北京农业大学)

摘 要

本实验用兔抗牛LH (bLH) 血清, ^{125}I -标记牛LH (^{125}I -bLH) 建立猪LH (pLH) 的异源放射免疫分析法。bLH、pLH的标准曲线及猪血清稀释曲线平行。此方法的特异性强, 与猪促卵泡素 (pFSH) 的交叉反应小于0.5%; 灵敏度为0.015~0.020ng/管; 猪血清添加pLH的回收率为 $96.8 \pm 3.8\%$; 测定内变异系数为3.3% ($n=14$), 测定间变异系数为5.5% ($n=5$)。用本方法测定, 注射LRH-A₂ 10分钟后猪血清LH的含量显著提高 ($P < 0.01$)。75、95、115、135、155日龄后备母猪 ($n=7$) 血清中LH含量依次为 1.50 ± 0.59 , 1.54 ± 0.42 , 1.76 ± 0.30 , 1.41 ± 0.17 , 1.88 ± 0.30 ng/ml; 发情时母猪 ($n=2$) 血清中LH含量为 7.07 ± 2.73 ng/ml。

关键词 猪促黄体素, 放射免疫, 异源, 牛促黄体素

前 言

养猪业在我国畜牧业中占有非常重要的地位, 而猪的繁殖是养猪生产的重要环节。测定猪LH在体内的变化情况有助于阐明猪的生殖生理规律, 为充分发挥猪的繁殖力提供依据。Niswender等 (1968) [1] 首次报道了“羊-羊系统”的猪LH异源放射免疫分析法。Niswender等 (1970) [2], Rayford等 (1971) [3] 又分别报道了猪LH的同源放射免疫分析法。这些方法的建立为猪生殖内分泌研究提供了非常有用的手段。目前国内尚未见到有关猪LH放射免疫分析法的报道。本实验用“牛-牛系统”放射免疫分析法测定猪LH获得成功。

材料与 方法

一、激素制剂

(一) bLH标准品: USDA-bLH-B-5; (二) pLH标准品: USDA-pLH-B-1; (三) pFSH: NIH-FSH-P₂; (四) USDA-bLH-I-1: 放射性碘标记用。

二、bLH的放射性碘标记

USDA-bLH-I-1按Greenwood等 (1963) [4] 报道的氯胺-T方法进行标记。在

* USDA-bLH-B-5, USDA-bLH-I-1, USDA-pLH-B-1由美国农业部赠送; NIH-FSH-P₂由美国国立卫生研究所赠送。本实验得到本校畜牧系张学贤同志, 畜牧所蔡正华同志的帮助, 特此致谢。

** 本文于1987年7月22日收稿。

反应管中加入 $5\mu\text{g}$ USDA-bLH-I-1/ $5\mu\text{l}$, PB150 μl (0.25M, pH7.4), 0.35mCi Na^{125}I , 然后加入新配制的氯胺-T $20\mu\text{g}/10\mu\text{l}$, 反应2分钟, 加入 $44\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ 的偏焦亚硫酸钠和 $50\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ 的碘化钾终止反应。立即上 Sephadex G-50 柱分离碘化后的 LH, 用 0.05MPB (pH7.4, 含 0.1% BSA) 洗脱。标记得到 ^{125}I -bLH 的比活性为 $25\sim 30\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 。

三、兔抗bLH血清的制备

参照 Vaitukaitis 等 (1971) [5] 报道的微量免疫方法, 用 USDA-bLH-B-5 免疫 5 只家兔制备抗血清。免疫程序见文献 [6]。1^o 兔在免疫过程中得病死亡, 其余 4 只兔均产生符合 bLH 放射免疫分析的抗血清 [6]。但只有 3^o 兔抗血清可用于猪 LH 放射免疫分析。此抗血清的稀释度为 1:5000, 与 bFSH、bTSH 的交叉反应分别小于 0.1% 和 0.82%, 对 bLH 的亲合常数 $k = 1.19 \times 10^{11}\text{M}^{-1}$ [6]。

四、抗兔 γ -球蛋白抗体(第二抗体)由上海生物制品研究所提供

五、放射免疫分析

(一) 试剂: PBS-0.01M 磷酸盐缓冲液生理盐水 (pH7.4), 用于稀释标准品种抗血清。温育液—0.05M PBS, 内含 2% 正常兔血清, 0.025M EDTA。

(二) 标准曲线和样品的测定: 标准管和样品管均为双管或三管测定。各测定管的最终反应容积为 $900\mu\text{l}$ 。制作标准曲线的试管中加入倍比稀释的 USDA-bLH-B-5 或 USDA-pLH-B-1 (分别为 0, 0.039, 0.078, 0.156, 0.313, 0.625, 1.250, 2.500 ng) $100\mu\text{l}$ 。样品管中加入待测猪血清 $100\mu\text{l}$ 。然后每管加入 1:5000 抗血清 $100\mu\text{l}$, 混匀后在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保持 18~20 小时。然后加 $100\mu\text{l}$ ^{125}I -bLH (约 10000 CPM), 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 12~14 小时, 加入 $100\mu\text{l}$ 第二抗体和 $500\mu\text{l}$ 温育液, 继续在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 12 小时, 最后以 $2000 \times g$ 离心 15 分钟 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), 在 FJ-2003/100 γ -免疫计数仪上分别测定 T 和 B。数据处理见文献 [6]。

六、样品的制备

后备枫径母猪一头, 在注射 $5\mu\text{g}$ LRH-A₂ (宁波水产激素制品厂产) 前和注射后 10 分钟, 颈静脉采血。雌性小型香猪分别在 75、95、115、135、155 日龄 ($n=7$) 和发情时 ($n=2$) 从颈静脉采血。采集的血液在室温静置分离血清, 于 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待测。

结果与讨论

一、抗血清的筛选

用 2^o、3^o、4^o、5^o 兔抗血清 (稀释倍数依次为 5.0×10^5 , 5.0×10^5 , 1.0×10^4 , 1.1×10^5), ^{125}I -bLH 和 pLH 制作的剂量反应曲线 (见图 1)。如图 1 所示, 3^o 兔抗血清适用于 pLH 的放射免疫分析, 而其余抗血清所作的剂量反曲线不符合放射免疫分析的要求。因此, 以下各项测定均使用 3^o

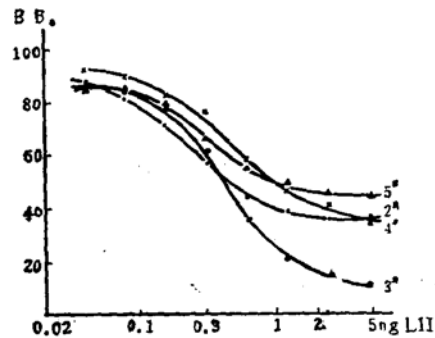


图 1 不同抗血清与 pLH 剂量反应曲线

兔抗血清。Niswender等〔7〕报道,用羊LH免疫30只家兔,只有一只兔的抗血清适用于测定大白鼠LH。这些结果表明,不同个体兔产生的抗LH血清和其它种动物LH的交叉反应程度有很大差异。

二、剂量反应曲线平行试验

用3^{*}兔抗血清和USDA-bLH-B-5, USDA-pLH-B-1制作的标准曲线及猪血清稀释曲线见图2。经logit转换,直线化后的标准曲线见图3。它们的直线回归方程分别为: $y_1 = 5.809 - 2.249x_1$; $y_2 = 5.889 - 2.252x_2$; $y_3 = 4.865 - 2.724x_3$; 对这三个方程的斜率进行t-检验,证明bLH、pLH标准曲线和猪血清稀释曲线是平行的。因此,在没有pLH标准品的情况下,可用bLH标准品作为测定猪LH的参考标准。

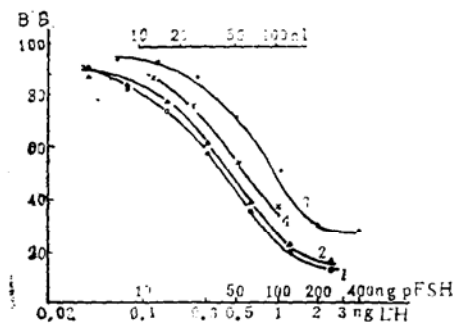


图2 标准曲线、猪血清稀释曲线及 NIH-FSH-P₂交叉反应曲线

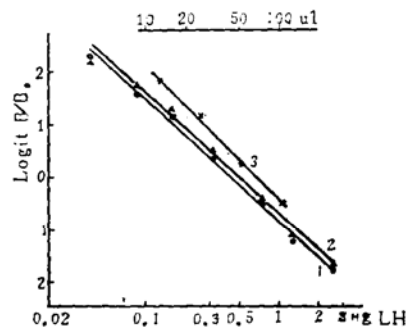


图3 直线化后的标准曲线和血清稀释曲线

三、特异性

3^{*}兔抗血清与NIH-FSH-P₂的交叉反应曲线见图2。计算得出与NIH-FSH-P₂的交叉反应小于0.5%。表明此方法能特异测定猪LH。

四、灵敏度

用B₀管的平均结合率减2SD值的方法计算,本分析法的灵敏度为0.015-0.020ng/管USDA-pLH-B-1,或0.15-0.20ng/ml血清。能够测出处于不同生理状态的猪血液中LH含量。

五、准确性和精密度

猪血清添加USDA-pLH-B-1的回收率见表(测定结果减去血清本身的LH含量)。平均回收率为 $96.8 \pm 3.8\%$,回收量与添加量的相关系数 $r = 0.999$ ($P < 0.01$),直线回归方程 $y = 1.04x - 0.69$ 。回收率良好,测定系统不受猪血清中其它因素的干扰。

表 猪血清中添加USDA-pLH的回收率

添加量 (pg)	500	250	125	62.5
回收量 (pg)	483.2	231.0	123.5	59.8
回收率 (%)	96.6	92.4	102.8	95.7

测定内变异系数为3.3% ($n = 14$),测定间变异系数为5.5% ($n = 5$)。

六、样品测定结果

注射LRH-A₂前猪血清LH含量为0.52ng/ml, 注射10分钟后含量提高为4.38ng/ml。说明此GnRH类似物能促使猪垂体分泌LH。同时也进一步表明本分析法能特异地测出猪血液中LH的变化情况。

雌性小型香猪在75、95、115、135、155日龄血清中LH含量分别为 1.50 ± 0.59 , 1.54 ± 0.42 , 1.76 ± 0.30 , 1.41 ± 0.17 , 1.88 ± 0.30 ng/ml ($\bar{X} \pm SD$)。说明从断奶后至性成熟, 血液中LH基础水平没有明显变化。由于采血时间间隔长, 该猪种后备母猪在性成熟前不同阶段垂体LH的分泌特点有待于进一步研究。发情时血清中LH含量为 7.07 ± 2.73 ng/ml, 显著高于基础水平的LH含量 ($P < 0.01$)。

小结: 上述结果表明, 本实验建立的“牛-牛系统”LH放射免疫分析法完全可用于测定猪LH。此方法的特异性、灵敏度、精确性和准确性等质量控制指标均达到或超过国外文献报道的同类方法的水平^[1~3]。可作为猪生殖生理研究的一个重要手段。

参 考 文 献

- [1] Niswender, G. D. et al., 1968. Radioimmunoassay radioimmunologic studies with murine, bovine, ovine and porcine luteinizing hormone. In: Gonadotropins (E. Roseberry ed.), Geron-X, Inc., Los Alamos, Calif., 299~306.
- [2] Niswender, G. D. et al., 1970. Radioimmunoassay of serum levels of Luteinizing hormone throughout the estrus cycle in pigs. *Endocrinology*, 87: 576.
- [3] Royford, P. L. et al., 1971. Radioimmunoassay determination of LH concentration in the serum of female pigs. *Endocrinology*, 88: 707.
- [4] Greenwood, F. C., et al., 1963. The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89: 114.
- [5] Vaitekaitis, J. et al., 1971. A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocri. Metab.* 33: 988.
- [6] 仲跻峰等, 1989, 牛促黄体素 (bLH) 同源放射免疫分析法的建立. *畜牧兽医学报*, 20(1): 7~12.
- [7] Niswender, G. D. et al., 1968. Radioimmunoassay for rat luteinizing hormone with anti-ovine LH serum and ovine LH-¹³¹I. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 128: 807~811.

A HETEROLOGOUS RADIOIMMUNOASSAY FOR PORCINE LUTEINIZING HORMONE (LH)

Zhang Zhiming, Zhong Jifeng, Sun Tuo, An Min, Dong Wei
(Department of Animal Science, Beijing Agricultural University)

Abstract

A highly sensitive double antibody radioimmunoassay for measuring serum LH in the pig has been developed by using rabbit anti-bovine LH serum and radioiodinated bovine LH. In this heterologous system, the

dose-response curve of bovine LH was parallel to that of porcine LH. Purified porcine FSH (NIU-FSH-P2) showed cross-reactivity of less than 0.5%. The sensitivity of the assay was found to be 0.015~0.020ng per tube for USDA-pLH-B-1. The recovery of added porcine LH to Serum was $96.8 \pm 3.8\%$. The coefficients of variation within a single assay and between assay were 3.3% and 5.5% respectively. By employing this assay, the concentrations of LH (mean \pm s.d.) in the sera of female Xiang Zhu pig on day 75, 95, 115, 135, 155 after birth (n=7) and at estrus (n=2) were measured as 1.50 ± 0.59 , 1.54 ± 0.42 , 1.76 ± 0.30 , 1.41 ± 0.17 , 1.88 ± 0.30 and 7.07 ± 2.73 ng/ml. Ten minutes after $5\mu\text{g}$ LRH-A₂ injection, the LH concentration in gilt serum was significantly elevated (0.52 v.s. 4.38 ng/ml).

Key words Porcine luteinizing hormone, Radioimmunoassay, Heterologous, Bovine luteinizing hormone

请您订购《中国畜牧杂志》

(双月刊)

《中国畜牧杂志》系中国畜牧兽医学会主办的中央级全国畜牧综合性科技和学术刊物。本刊具有提高与普及,面向生产、面向基层、注重实用,讲究效益等特点。

设有:科学试验、调查报告、经验交流、基础知识讲座、畜牧兽医站、专业户园地、文献综述及学术动态等栏目。内容丰富,材料新颖,选题严谨,有较强的科学性、实用性,适合全国广大畜牧兽医院、校师生、科研、生产技术人员及农村专业户、农村知识青年订阅。

1953年创刊,双月刊,国内外公开发行。64页,每期定价0.90元。北京市邮局总发行。请向当地邮局(所)办理订购。国内邮订代号82—147,国外代号BM452。

编辑部地址:北京市海淀区北京农业大学畜牧学院内。电话:2582244转405

邮政编码:100094