

家鸡促黄体素放射免疫测定法的建立

施振旦

(华南农业大学动物科学系, 广州 510642)

摘要 建立了测定鸡血浆样品 LH 的放射免疫测定方法。所用 LH 参照标准为 USDA-cLH-K-3, 碘化标记 LH 为 USDA-cLH-I-3, 第一抗体为兔抗鸡 LH(USDA-AcLH-5), 第二抗体为驴抗兔血清。碘化采用了改进氯胺 T 方法, 减少了氯胺 T 的用量, 并省略了偏重亚硫酸钠的使用, 碘化标记的 LH 比放射性为 $55 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 。测定的灵敏度为 0.025 ng/mL 变异低于 15%。母鸡血浆样品倍比稀释产生的结合抑制曲线与标准曲线平行; 测定不同繁殖期母鸡血浆样品 LH 显示出显著差异且变化规律符合繁殖活动的变化。以上结果证明本方法可以用于测定家鸡血浆 LH 浓度。

关键词 家鸡; LH; 放射免疫测定

中图分类号 S 831.9

国外对禽类生殖内分泌的研究开展得很早, 并已经建立了许多生殖激素的测定方法, 包括促黄体素(LH)的放射免疫测定法(RIA)(Sharp et al, 1987)和酶联免疫测定法(ELISA)。国内对禽类生殖内分泌的研究起步较晚, 目前尚缺乏用来自禽类的生殖激素作为参照标准的测定法。有的研究使用了市场上供应的人用 LH 测定药盒进行禽类样品的 LH 测定, 由于蛋白质激素之间的种属差异, 造成抗人 LH 的抗体与禽类 LH 之间的结合能力较差, 使测定出的数值降低, 不能反映出不同生殖状态下 LH 的真实变化趋势(陈伟华等, 1994)。作者等在研究粤黄鸡就巢的工作中, 建立了以鸡 LH 作为标准和标记激素的放射免疫测定方法。现介绍如下。

1 材料与方法

1.1 试剂和溶液

鸡 LH 参照标准为 USDA-cLH-K-3, 用于同位素碘标记的 LH 为 USDA-cLH-I-3, 兔抗鸡 LH 抗血清为 USDA-AcLH-5, 均由美国农业部农业研究所属下 Germplasm and Gamete Physiology Laboratory 的 J. A. Proudman 博士赠送。第二抗体驴抗兔抗血清, 购自北京北方免疫研究所。

LH 碘化标记所用氯胺 T 溶液为含氯胺 T $58 \mu\text{g/mL}$ 的 0.25 mol/L 磷酸缓冲液(PB, $\text{pH}=7.4$, 下同), 必须在碘化前将 5.8 mg 氯胺 T 溶于 100 mL 0.25 mol/L PB 中新鲜配制。碘化反应终止液为含 1%碘化钾、1%溴酚蓝、16%蔗糖的 0.05 mol/L PBS ($\text{pH}=7.4$)。放射免疫测定分析液为含 0.1% BSA、0.01% 硫柳汞的 PBS 液; 抗体稀释液为含 0.05 mol/L EDTA 二钠的 PBS 液; 沉淀液为含 6%聚乙二醇(分子量 6 000)的 PBS 液。

1.2 cLH-I-3 的碘化标记

将 $5 \mu\text{g}$ cLH-I-3 装入 0.5 mL 的 eppendorf 管中, 加入 $30 \mu\text{L}$ 0.25 mol/L PB 以溶解 LH。

然后管内加入 0.5 mCi 的同位素碘 125 (Na^{125}I 溶液), 轻轻弹几下管子使内容物混合均匀。然后向管内加入 10 μL 氯胺 T 溶液(含氯胺 T 580 ng), 并加轻轻摇晃混合。反应 5 min 后, 向管中加入 100 μL 反应终止液, 随后加入 200 μL 含 10% 牛血清白蛋白(BSA)的 0.05 mol/L PB(pH=7.4)。然后将反应管中反应混合液加载到 15 cm $\times$ 1 cm 的 Sephadex G25 的层析柱上层析, 用 0.05 mol/L PB 洗脱, 每管收集洗脱液 0.3 mL(8 滴左右), 标记激素随指示剂溴酚蓝一起流出。然后将此含标记 LH 的洗脱液用放射免疫分析液稀释到每 100 μL 含 15 000 cpm。

1.3 放射免疫测定

将鸡 LH 标准品 cLH-K-3 用含 2% 就巢鸡血浆的分析液溶解, 并稀释配制成含 LH 分别为 16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.061、0.03 和 0 ng/mL 的标准样品。然后每管加入 100 μL , 并加 400 μL 分析液, 使体积达到 0.5 mL。样品管中根据样品中 LH 浓度的大致范围加入 50~200 μL 的样品血浆, 并用分析液将体积补至 0.5 mL。非特异结合管中加入 0.5 mL 分析液。

将第一抗体用含 0.5% 正常兔血清的抗体稀释液稀释至浓度为 1:12,500, 然后向标准浓度管和样品管中每管加入 200 μL 含 0.5% 正常兔血清的抗体稀释液。在向每管中加入 100 μL 标记 LH 后, 将全部试管置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 48 h 或在室温孵育 24 h。

用抗体稀释液将驴抗兔血清作 1:2 稀释, 除总管(T)外, 每管加入 100 μL , 然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h。之后向各管(T 管除外)加入 2 mL 沉淀液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 1 900 g 离心 30 min, 弃去上清液, 测定各管计数, 并计算出各样品 LH 浓度。

2 结果

2.1 碘化标记

用含 1% 磷钨酸的 0.5 mol/L HCl 沉淀反应混合液, 测得有 55% 的同位素碘 125 被掺入到激素 LH 中, 因此 LH 标记的比放射性为 55 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ 。

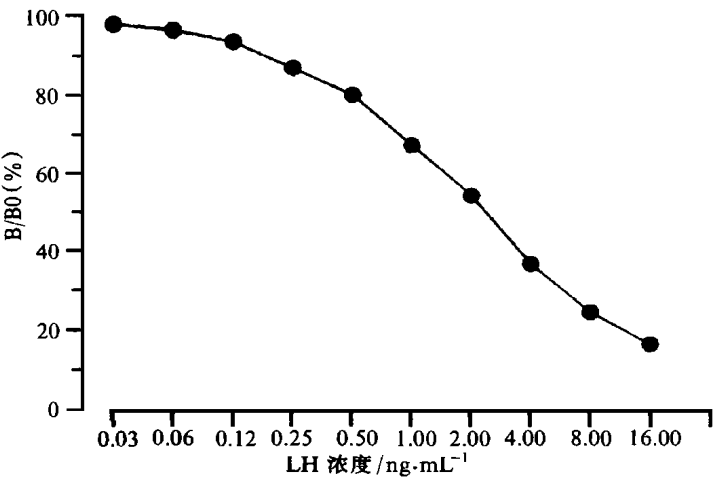


图 1 LH 标准曲线

2.2 LH 标准曲线

标准曲线见图 1, 各标准(除 B0 外)管的结合率和浓度分别经 Logit 和 Log 转换后, 相关系数为 0.994, 表明两者之间存在一直线线性关系。经此标准曲线计算的一鸡血浆样品及其用分析液作 2 倍和 4 倍稀释的 LH 估算浓度分别为: 0.27, 0.14 和 0.07 ng/mL, 说明样品作倍比稀释后的结合率曲线与标准曲线平行。另外用此方法测定母鸡在就巢期间的血浆 LH 浓度, 大大低于用氯丙嗪处理后终止就巢并开产的母鸡的血浆 LH 浓度(图 2)。这些数据说明该方法可以用于测定鸡血浆样品中 LH 的水平。

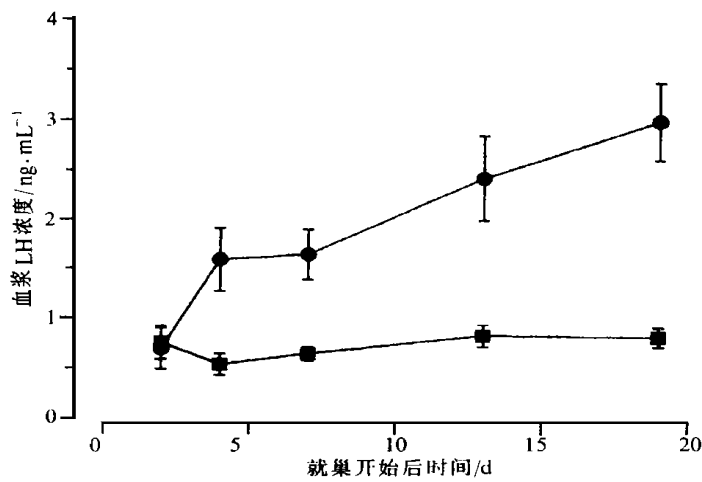


图 2 不同就巢状态下母鸡血浆 LH 浓度
● 在就巢第 2d 用氯丙嗪处理终止就巢的母鸡 (n=7), ■ 对照组就巢母鸡 (n=11); 垂直短线表示标准误差

2.3 质量控制

B0 管的结合率为 23% 至 29%。ED 75%、ED 50%和 ED 25% 分别为 0.66、2.29 和 7.92 ng/mL。灵敏度为每管 0.025 μ g, 对同一批内测定 3 个不同浓度 (1.39、1.62 和 3.52 ng/mL) 的样品算出的批内变异系数分别为 4.1%、10.4%和 7.4%。

3 讨论

本研究建立的鸡 LH 放射免疫测定方法在测定鸡血浆中 LH 的水平时, 表现出批内变异小, 重复性好。经本方法测定的 120 个在不同繁殖状态的鸡血浆样品, 全部样品 LH 浓度落在标准曲线范围内, 而且 LH 水平在母鸡的各繁殖状态下明显不同。

本方法在碘化标记中减少了氯胺 T 的用量并省略了偏重亚硫酸钠的使用。作者以前曾经用常规的氯胺 T+偏重亚硫酸钠的量要严格控制, 反应时间不能超过 60 s (Bailey, 1990), 标记常因使用放置过久的氯胺 T 而失败。而本方法可以在碘化过程中预先测定碘掺入率, 在掺入率太低时可以再次加入氯胺 T 达到最佳标记效果, 保证标记的成功。偏重亚硫酸钠作为一种还原剂, 常会使蛋白质激素中的某些氨基酸基因降解, 影响激素与抗体的结合能力。而本方法标记中用氯胺 T 量很少, 故反应时间可以很长, 避免操作时忙中出错, 终止反

应不使用偏重亚硫酸钠, 可以避免激素的被还原等问题。

参 考 文 献

- 陈伟华, 李定健, 陈 杰. 1994. 5-羟色胺在四季鹅抱窝中的作用. 南京农业大学学报, 17: 75~78
- Bailey G S. 1990. In vitro labelling. B. Proteins. In: Slater RJ, ed. Radioisotopes in Biology, a practical approach. New York: Oxford Universing Press 191~205
- Sharp P J, Dunn I C, Talbot R T N. 1987. Sex differences in the LH responses to chicken LHRH— I and II in the domestic fowl. J Endocrin, 115: 323~331

DEVELOPMENT OF A RADIOIMUNOASSAY FOR MEASUREMENT OF CHICKEN LH

Shi Zhendan

(Dept. of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642)

Abstract

A radioimmunoassay was developed for measurement of chicken plasma LH. The assay used UDSA—cLH—K—3 as reference standard, UDSA—cLH—I—3 as radio labelled ligand, rabbit anti—chicken LH (UDSA—AcLH—5) as first antibody, and donkey anti-rabbit antiserum as second antibody. Iodide radio labelling of chicken LH used a modified chloramine T method, which recuded the amount of chloramine T and omitted the use of sodium metabisufite, and produced the labelled hormone with a specific activity of 55 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. The assay sensitivity was 0.025 ng/mL and the variations were less than 15%. Serial dilutions of chicken samples exhibited a parallel inhibition curve to that of the standards. Plasma LH concentrations of samples from hens at different reproductive stages measured by this assay revealed significant differences and rational changing trends among the stages. These results validate the assay.

Key words chicken; LH; radioimmunoassay