

乳汁孕酮的放射免疫测定

李 永 鹏

(西北农学院畜牧兽医系研究生)

指导教师 王建辰教授

摘 要

本文介绍了测定乳汁孕酮的放射免疫方法。样品不经提取,直接进行测定。标准曲线的范围是 0—1200pg。灵敏度为 4pg。回收率 $91.6 \pm 3.17\%$ 。分析内 $CV = 4.4\%$ ($n = 25$),分析间 $CV = 7.5\%$ ($n = 9$)。共测定了 7 只奶山羊和 3 头奶牛的孕酮水平。其中 16 号羊产后的孕酮值是 $3.20 \pm 1.32\text{ng/ml}$; 6 只羊发情时(0—1 天)为 $0.83 \pm 0.23\text{ng/ml}$; 3 头持久黄体牛为 $2.74 \pm 3.28\text{ng/ml}$ 。并对测定方法作了较全面的讨论。

引 言

孕酮是由黄体,胎盘和肾上腺皮质产生的一种甾体激素,与家畜的繁殖生理现象密切相关。在发情周期和妊娠过程中,它的变化明显,规律性强,能反映出卵巢机能的变化。因此,观察乳汁孕酮含量的变化,对家畜的繁殖管理和科学研究都有十分重要的意义。乳汁孕酮的测定方法,过去以化学分析法和竞争蛋白结合法为主。近年来所出现的放射免疫分析法(RIA)更为理想,因其灵敏度高,特异性强,操作较简便,易于半自动化和自动化操作。国外从 1973 年开始报导乳汁孕酮的放免测定(Heap 等),但国内至今未见正式资料,因此将我们建立的乳汁孕酮放射免疫测定法介绍如下。

材 料 与 方 法

(一) 采样

采用发情 0 天的晚上前乳(开始挤出的奶)为标准乳。被测样品均采用下午末乳(最后挤出的奶),每次取 5 ml。采样后立即放 -20°C 贮存。采样点较远的乳样,在加入防腐剂重铬酸钾溶液后转运到实验室,放 4°C 贮存。

本方法的建立曾得到段恩奎和薛立群同志的协助,本院畜牧场和西安第三奶牛场提供实验动物;中国科学院动物研究所内分泌生理组赠送孕酮抗体,院同位素室协助测定计数,谨在此一并致谢。

重铬酸钾溶液的配制及用量：重铬酸钾15g，加蒸馏水100ml，33℃浴中完全溶解。采样时按5 ml乳汁用0.05ml重铬酸钾溶液计算。

(二) 试剂的准备与配制

1. $[1,2,6,7-^3\text{H}]$ 孕酮 (^3HP)：上海原子核研究所生产。比放射性80 居里/毫克分子。临用时稀释成28400DPM/0.1ml的工作液。

2. 标准孕酮：上海第十二药厂生产。

3. 孕酮抗体 (Ab)：中国科学院动物研究所内分泌研究室提供。有效滴度是1 : 8000~1 : 10000。

4. 0.05M 磷酸盐缓冲液 (PBS; pH7.0)：称NaCl 4.5g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.5g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.25g于量筒中，加重蒸馏水至300ml溶解，再加入0.5g的明胶和200ml重蒸馏水，在54℃水浴中溶解。最后加入0.5g的 NaN_3 ，调pH至7.0，4℃贮存。

5. 葡聚糖活性炭悬浮液 (dcc)：取葡聚糖25mg，溶解于50ml PBS，再加入1.25g的活性炭末，搅拌1小时，放4℃保存。

6. 闪烁液：2,5-二苯基恶唑 (PPO) 2g，1,4-双-[5-苯基恶唑-2] 苯 (POPOP) 0.06g，甲苯500ml。

(三) 仪器设备

1. 40—200 μl 微量可调移液管：中国科学院生物物理研究所制造。

2. 50 μl 、100 μl 微量注射器：上海注射器三厂制造。

3. 康氏电力振荡机：北京通县城关医疗器械厂制造。

4. FJ—353双道液体闪烁计数器：西安262厂制造。

(四) 测定步骤

1. 室温解冻乳样。

2. 稀释乳样：根据不同生理或病理状态下乳样的孕酮含量确定稀释度。如发情期的孕酮量较低，选用2 : 0.5或1 : 0.5 (奶 : PBS)。而妊娠或持久黄体时的孕酮量较高，则选用1 : 2或0.5 : 2。

3. 标准曲线及样品的制备

(1) 按表1将标准曲线和样品管进行编码，于顺序加入试剂后摇匀。

(2) 选用发情0天的晚上前乳为标准乳。

(3) 从加Ab起，所有步骤均在冰浴下进行。

(4) 温育期的温度是4℃，时间为7—16小时。

(5) dcc加入前在冰浴中充分振荡。

(6) 加入dcc振荡后冰浴20分钟，再以4000转/分离心5分钟，冷却半小时后取上清液0.6ml，加入盛有5 ml闪烁液的闪烁杯中。

4. 平衡过夜后测定计数。乳汁孕酮RIA整个操作流程见图1所示。

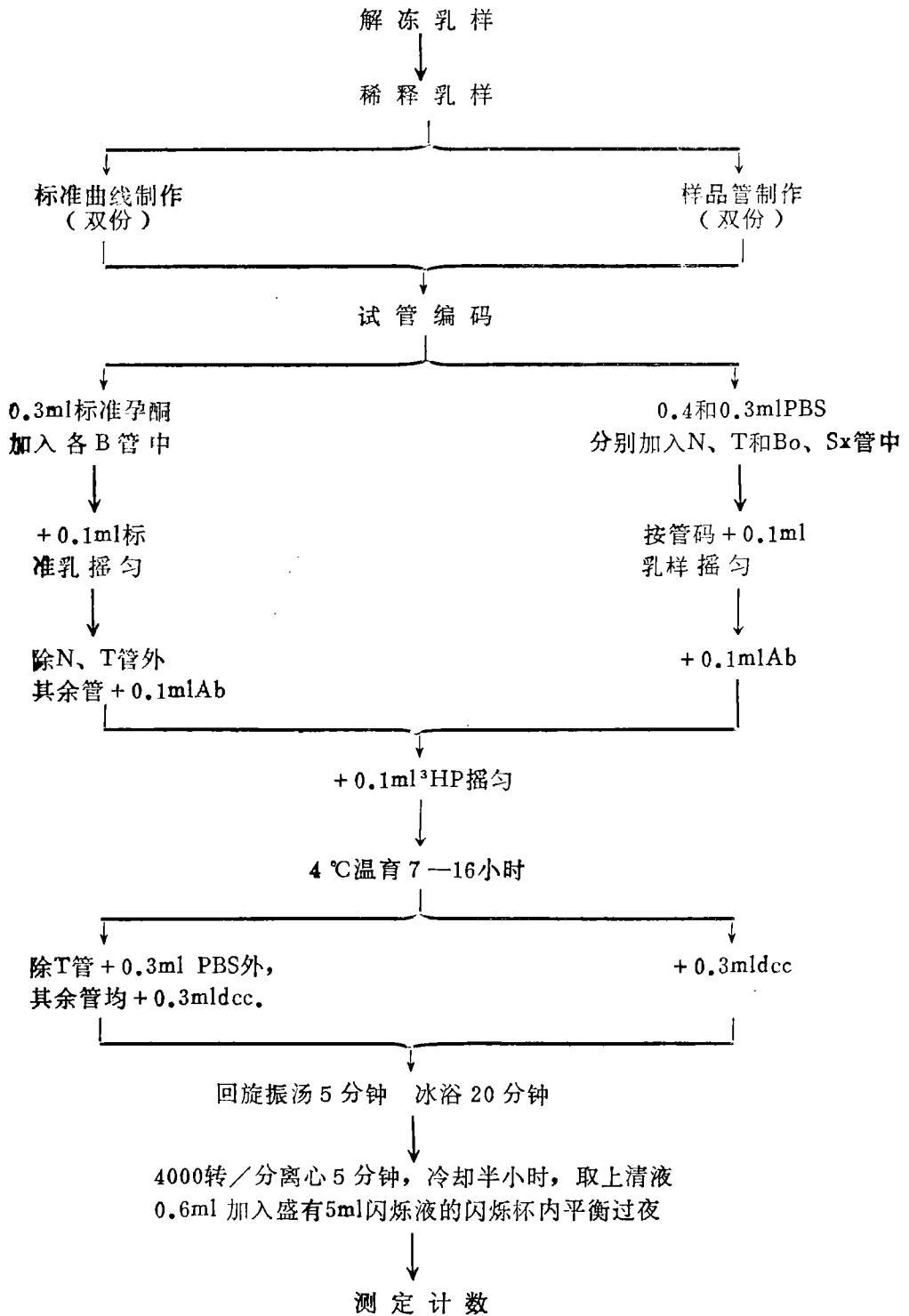


图1 孕酮RIA流程

表1 孕酮—RIA常规用表

组 别	标准品 (ml)	PBS(ml)	样 品 (ml)		Ab (ml)	³ HP (ml)	温	dcc (ml)
			标准乳	乳 样				
总放射性 (T)	——	0.4	0.1	——	——	0.1	温	PBS 0.3
非特异性结合 (N)	——	0.4	0.1	——	——	0.1		0.3
零标准 (B ₀)	——	0.3	0.1	——	0.1	0.1		0.3
标准 1 (B ₁)	0.3	——	0.1	——	0.1	0.1		0.3
标准 2 (B ₂)	0.3	——	0.1	——	0.1	0.1		0.3
标准 3 (B ₃)	0.2	——	0.1	——	0.1	0.1	育	0.3
标准 4 (B ₄)	0.3	——	0.1	——	0.1	0.1		0.3
标准 5 (B ₅)	0.3	——	0.1	——	0.1	0.1		0.3
标准 6 (B ₆)	0.3	——	0.1	——	0.1	0.1		0.3
标准 7 (B ₇)	0.3	——	0.1	——	0.1	0.1		0.3
标准 8 (B ₈)	0.3	——	0.1	——	0.1	0.1		0.3
样品 S _x	——	0.3	——	0.1	0.1	0.1		0.3

(五) 计算

乳汁孕酮水平的计算参照梁素香等 (1979) 的方法⁽¹⁾。将样品结合率的 logit 值直接代入标准曲线的回归方程, 求出实验体积的孕酮含量, 再按下式求出每毫升乳汁的孕酮含量。

$$\text{孕酮 ng/ml 乳汁} = \text{孕酮 ng/管} \times \frac{\text{稀释后 1ml 乳样总体积}}{\text{测定样品的体积}}$$

结 果

本方法制定的标准曲线范围是 0—1200pg, 0pg 与 ³HP (28400Dpm) 的最大结合率稳定在 35—55% 之间; 1200pg 一点的结合率是 8—11%。

1. 灵敏度: 根据实验的标准曲线, 用 2 × SD 方法计算⁽²⁾, 灵敏度为 4 pg。

2. 准确性: 用回收试验鉴定方法的准确性。对未知孕酮含量的乳样添加不同量的标准孕酮, 其回收率见表 2 (n = 2)。

表2 内标准回收试验

投入量 (pg)	测定量 (pg)	回收率 (%)	平均回收率 (% ± SD)
25	21.8	87	91.6 ± 3.17
50	47.2	94.4	
100	93.6	93.6	
200	186.9	93.5	
400	358.9	89.7	

3. 精密度：对特定样品进行重复测定，以表示方法的精密度。分析内样品测定的变异系数CV内 = 4.4% (n = 25)；分析间样品测定的变异系数CV间 = 7.5% (n = 9；表3)。3次不同时期测定的标准曲线如表4所示。

表3 重复试验

测定次数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	平均 ± SD	CV%
测定结果 (ng/ml)	10.3	9.9	9.7	8.9	11.3	9.9	9.8	9.1	10.7	10.0 ± 0.74	7.5

表4 标准曲线的重要性

标 P 量 (pg)	5月28日测		6月10日测		6月13日测		S D	C V (%)
	CPm	B%	CPm	B%	CPm	B%		
0	3,659	42.7	4,029	51.0	3,929	47.2	4.15	8.8
25	3,138	85.8	3,450	85.6	3,415	86.9	0.70	0.81
50	2,459	67.2	3,057	75.9	2,782	70.8	4.37	6.10
100	1,963	53.6	2,504	62.1	2,309	58.7	4.28	7.4
200	1,352	36.9	1,701	42.9	1,399	35.6	3.89	10.1
400	781.5	21.4	1,080	26.8	960	24.4	2.71	11.2
800	521	11.2	706	17.5	537	13.6	2.10	1.39
1200	373	10.0	421	10.4	408	10.3	0.21	2.00
总计数管 (cpm)	8,566		7,894		8,331			

4. 孕酮值：用本法测定了7只奶山羊和3头奶牛不同时期的孕酮水平(表5,6,7)。

其中16号羊产后1—31天的孕酮值是 $3.20 \pm 1.32 \text{ ng/ml}$ ，6只羊发情时是 $0.83 \pm 0.23 \text{ ng/ml}$ ，3头持久黄体牛是 $27.4 \pm 3.28 \text{ ng/ml}$ 。

表5 16号奶山羊产后乳汁孕酮的变化

产后天数(天)	1	3	5	7	9	11	13	15	19	21	23	25	27	29	31	$\bar{X} \pm SD$
孕酮 ng/ml	2.20	1.10	1.44	3.10	2.33	2.39	2.80	3.40	4.00	4.30	6.6	4.00	3.70	3.20	3.40	3.20 ± 1.32

表6 奶山羊发情时的乳汁孕酮水平

羊号	393	456	491	430	405	388	$\bar{X} \pm SD$
孕酮 (ng/ml)	0.70	0.85	1.15	1.05	0.55	0.70	0.83 ± 0.23

表7 三头持久黄体牛孕酮水平的变化

牛号	病史	孕酮 (ng/ml)					直检情况
		6日4日	6月7日	6月10日	6月16日	$\bar{X} \pm SD$	
2003	80年12月产犊后一直不发情	19.6	21.7	26.9	28.9	27.4 ± 3.28	左侧卵巢有一持久黄体
3556	81年2月产犊后一直不发情	25.3	30.4	24.5	28.9		右侧卵巢有一持久黄体
3137	80年11月产犊后一直不发情	31.2	27.2	30.6	34.3		右侧卵巢有一持久黄体

讨 论

(一) 样品采集: 根据挤奶的时间变化, 通常将乳样分为前乳、末乳和全乳(每次挤的混合奶)。由于乳汁孕酮水平与脂肪含量有关, 各种乳样的脂肪含量不同⁽³⁾, 故采样时间和乳样类型必须一致。实验证明, 末乳具有取样方便, 污染可能性小, 孕酮量高和有时间纠正错样等优点, 在实践中应该采用。

(二) 防腐剂的选择与乳样的转运: 为了防止乳样变质, 给新鲜乳样要加入防腐剂。所用防腐剂有氯化汞, 福尔马林和重铬酸钾。经比较以重铬酸钾为好, 重铬酸钾不干扰乳汁孕酮的测定(表8)。由于乳汁的孕酮相当稳定, 所以加入防腐剂的乳样, 其孕酮含量并不因转运途中温度的影响而减损(表9)。

(三) 标准乳的选用: 为了使标准曲线管和样品管在实验中的反应条件一致, 给标准管需加入与被测样品等量的标准乳(少含或不含孕酮)。据报导, 标准乳应取于发情0天或摘除卵巢的家畜, 因为这些家畜乳中的孕酮量甚微。我们曾对1只奶山羊摘除两侧卵巢, 发现术后24小时内的孕酮值是 $2.70 \pm 1.10 \text{ ng/ml}$, 1—10天是 $2.50 \pm 0.80 \text{ ng/ml}$ 。PoPe(1969)在对2头奶牛摘除两侧卵巢后, 测定了200天内的血浆孕酮水平, 其结

表 8 不同防腐剂效果试验

组 别	对照	重铬酸钾	福 尔 马 林		氯 化 汞	
			0.1%	0.02%	0.01%	0.001%
测定值 (ng/ml)	14.1	14.1	10.1	11.8	13.9	11.1

q 检验，重铬酸钾与对照组无显著差异，其余均差异明显。

表 9 孕酮减损试验*

间隔时间 (小时)	对照	常 温 放 置								
		3	6	12	24	48	72	144	216	
孕 酮 (ng/ml)	12.3	11.6	12.1	11.8	12.9	12.3	11.1	10.2	11.8	

* 对照乳样在采样后立即放 -20°C 贮存，其余乳样按表中间隔时间，由常温 ($12.5-27^{\circ}\text{C}$) 下转入 -20°C 保存。

t 检验 $P>0.01$

果平均孕酮值低于 2ng/ml ⁽⁷⁾。相比之下，家畜发情 0 天的乳汁孕酮水平很低（奶中 $0.70\pm 0.20\text{ng/ml}$ ， $n=3$ ；奶山羊 $0.83\pm 0.23\text{ng/ml}$ ， $n=6$ ），选用这个时间的乳样作为标准乳较好。

（四）测定结果：用本方法对 7 只奶山羊和 3 头奶牛乳样的测定结果，孕酮水平和变化类型与文献报告的相近似⁽⁴⁾⁽⁵⁾。

（五）泌乳期对孕酮水平的影响：乳汁孕酮水平与乳脂含量成正相关，乳脂含量随泌乳时间而变化⁽³⁾。一般情况下，奶牛泌乳的第 1 个月乳脂含量低，以后逐渐升高，6 个月左右达较高值⁽⁶⁾。因此，泌乳时间越长，乳汁孕酮水平就越高（图 2）。

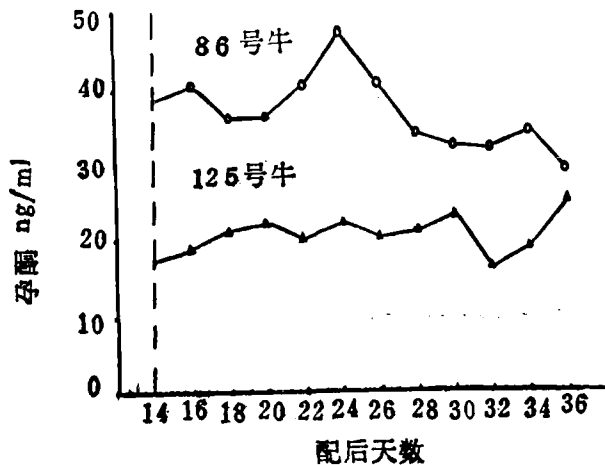


图 2 两头牛配种后第 14—36 天孕酮水平的变化

牛 号	泌 乳 时 间 (天)	孕 酮 (ng/ml)											
		第 14 天	第 16 天	第 18 天	第 20 天	第 22 天	第 24 天	第 26 天	第 28 天	第 30 天	第 32 天	第 34 天	第 36 天
125	85	17.2	19.7	21.7	22.2	20.3	22.4	20.3	21.4	23.8	16.8	19.2	25.5
86	154	38.6	40.3	36.2	36.2	40.8	47.6	40.8	34.5	32.5	32.1	34.1	29.8

t检验 $P < 0.01$

参 考 文 献

1. 梁素香等, 避孕药科研参考资料 114—119, 1979.
2. 曹梅讯等, 避孕药科研参考资料 56—68, 1979.
3. R.B.Heap等 (明如镜译), 畜牧兽医文摘 5, 56—59, 1978.
4. G.E. lamming等, Br·Vet.J. 132(5), 507—517, 1976.
5. J.A. Pennington等, J. Agric. Sci.58.5, 1977.
6. C.Craplet, The Dairy Cow.93—102, 1963.
7. G. S. PoPe 等, J. Reprod. Fert. 20, 369—381, 1969.

Radioimmunoassay of Milk Progesterone

Li Yong peng

(Northwestern College of Agriculture)

Abstract

Radioimmunoassay of milk progesterone was described in this paper. The samples were determined directly without extraction. The standard curve ranged from 0 to 1,200 pg. Sensitivity for assay was 4 pg. The recovery of unlabelled progesterone from milk was 91.6 ± 3.17 . The interassay variabilities were 4.4 and 7.5% respectively. Levels of progesterone of the 7 milk goats and the 3 milk cows were measured with radioimmunoassay. The value was $3.20 \pm 1.32 \text{ ng/ml}$ in No. 16 milk goat (1 to 31 days post partum); $0.83 \pm 0.23 \text{ ng/ml}$ in the 6 milk goats during the oestrus (0-1 day) and $27.40 \pm 3.28 \text{ ng/ml}$ in the 3 milk cows with persistent corpus luteum. An overall discussion was also made on this method.