

乳汁孕酮测定方法的改进*

李永鹏 耿果霞

(西北农学院家畜生殖内分泌研究室)

摘 要

孕酮是与生殖生理密切相关的雌性激素。1973年,Heap在英国首次建立了乳汁孕酮的放射免疫分析法;1982年,国内建立了这种测定法。为了提高测定效率,经多次实验对该法进行了改进研究,取得了满意的效果。改进包括三个方面。第一,用等量的明胶磷酸盐缓冲液代替加入标准曲线管中的标准奶;第二,将温育温度由原来的4℃改为37℃;第三,将温育时间由原来的8~16小时缩短为20分钟。这些改进不但使所建立的标准曲线更加理想,而且缩短了测样时间。用本法测定的秦川牛和摩拉水牛产后未乳的孕酮水平和范型与文献报道相近似。

引 言

孕酮是一种黄体激素,属于性腺激素,与家畜的生殖生理机能密切相关。目前,检测乳汁孕酮水平的变化已成为监控母牛繁殖的有效手段。

乳汁孕酮测定方法自1982年在国内建立以来,已被应用于奶牛、山羊和新疆褐牛的发情鉴定、早妊诊断、不孕症诊治和有关基础理论的研究等^(1,2,3,4,5),并日益显示出它的实用价值。

在本研究室1982年建立的乳汁孕酮放射免疫分析法的基础上,本研究再次对该测定法进行改进实验,其目的是:①寻求标准奶的代用品,使所建立的标准曲线更为理想;②寻找温育的最适温度,减少温育时间,提高测定效率。

材料和方法

(一) 试剂

1) (1、2、6、7-³H) 孕酮 (³HP): 上海原子核研究所生产,比放射性80居里/毫克分子。

2) 标准孕酮: 上海第十二药厂生产。

*①本文承王建辰教授、鲁安太讲师审阅,特此致谢。

②本刊编辑室收到此稿的时间:1985年1月22日。

3)孕酮抗血清 (Ab) : 中国科学院动物研究所内分泌室提供, 最佳稀释度是 1 : 8,000~1 : 10,000。

4)0.05M明胶磷酸盐缓冲液 (GPBS; pH = 7.0) 。

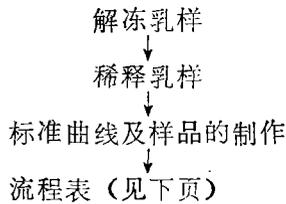
5)2.4%葡聚糖活性炭悬浮液 (DCC) : 葡聚糖50mg; 活性炭末2.4g; GPBS100 ml。

6)闪烁液: 对三联苯1.0g; 1,4—22 [5—苯基咪唑—2] 苯 125mg; 无水乙醇20 ml, 甲苯1000ml。

(二) 测定

改进的乳汁孕酮测定方法是在本研究室 (1982) 所建立的方法基础上, 将加入标准曲线管的标准奶用等量的GPBS代替, 将温育时间由 4℃条件下 8—16小时, 改变为 37℃水浴20分钟; 奶样的稀释度、发情期为 1 : 0.5 (奶:GPBS), 妊娠期或黄体期为 1 : 2.5或 1 : 3。

改进的乳汁孕酮测定操作流程如下:



(三) 计算

先求出实验体积的孕酮含量, 再按下式计算出每毫升乳汁的孕酮值:

$$\text{孕酮 ng/ml 乳汁} = \text{孕酮 pg/管} \times \frac{\text{稀释后 1ml 乳汁总体积}}{\text{实际测样的体积}} \times \frac{1}{1000}$$

结 果

(一) 标准曲线

本方法建立的标准曲线的测量范围是 0~400Pg, 0pg与³HP (16071Dpm) 的最大结合率为35—50%, 标准品、标记抗原与抗血清的结合率如图 1 所示。

图 2 表示用改进后方法与原方法 (1982) 所得的直线化标准曲线。可以看出, 用两种方法所得的标准曲线经logit直线化后, 前者在y'坐标上的各点都重复或靠近直线化的标准曲线, 而后者却较多的偏离直线化的标准曲线。

(二) 回收试验

给元离子水中分别加入100、200、300和400Pg的孕酮标准品, 回收率分别为95.4%、103.6%、91.5%和91.8%, 平均为95.6%。

流程图

管号	标准品 (pg)	3Hp (μl)	GPBS (ml)	奶样 (ml)	Ab (ml)	DCC (ml)	
总放射性 (T)	1	—	10	0.7	—	—	—
	2	—	10	0.7	—	—	—
非特异性结合 (N)	3	—	10	0.4	—	—	0.3
	4	—	10	0.4	—	—	0.3
零标准 (B ₀)	5	—	10	0.2	—	0.2	0.3
	6	—	10	0.2	—	0.2	0.3
标准 1 (B ₁)	7	12.5	10	0.2	—	0.2	0.3
	8	12.5	10	0.2	—	0.2	0.3
标准 2 (B ₂)	9	25	10	0.2	—	0.2	0.3
	10	25	10	0.2	—	0.2	0.3
标准 3 (B ₃)	11	50	10	0.2	—	0.2	0.3
	12	50	10	0.2	—	0.2	0.3
标准 4 (B ₄)	13	100	10	0.2	—	0.2	0.3
	14	100	10	0.2	—	0.2	0.3
标准 5 (B ₅)	15	200	10	0.2	—	0.2	0.3
	16	200	10	0.2	—	0.2	0.3
标准 6 (B ₆)	17	400	10	0.2	—	0.2	0.3
	18	400	10	0.2	—	0.2	0.3
样品 (S _x)	19	—	10	—	1.0	0.2	0.3
	20	—	10	—	1.0	0.2	0.3

抽

温

干

育

振荡5',
冰浴15',
4000转/分
的速率
离心5',
倒出上清
液隔夜计
数。

(三) 重复性和一致度的试验

取同一份奶样，分别置于4个反应管（双管），按本法进行测定，平均值为1.8毫微克/毫升，标准差为0.1，变异系数为5.6%。将3份奶样分别在3次实验中进行测定，变异系数为9.0%，说明本法的一致性和重复性均较好。

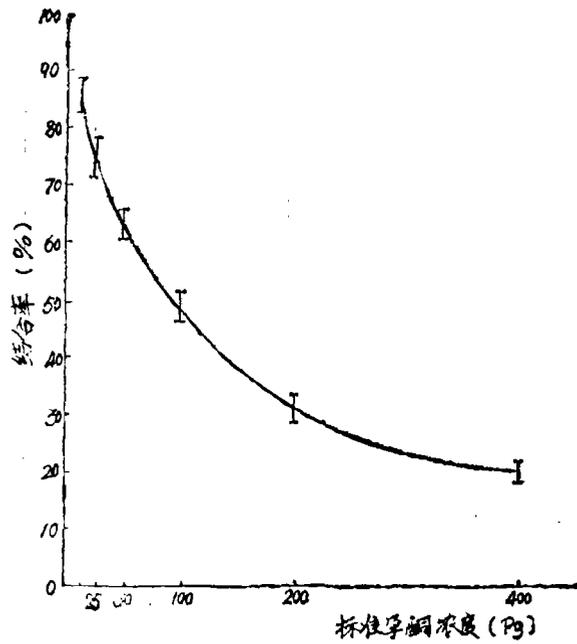


图1 标准品、标记抗原与抗体的结合百分率

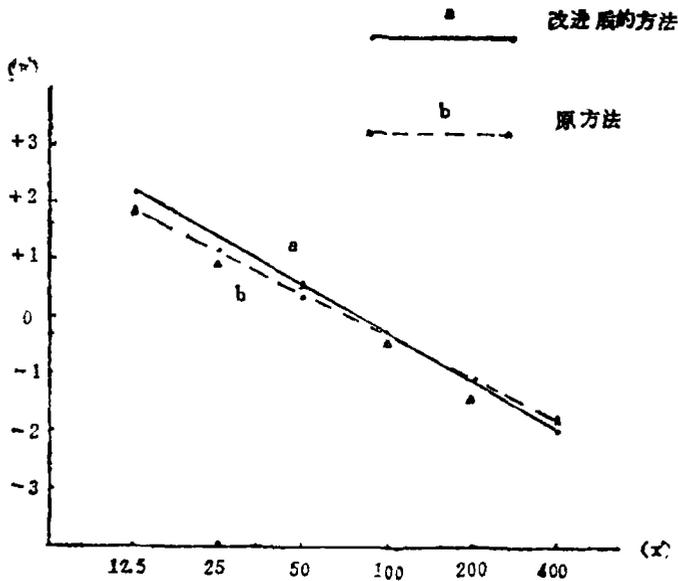


图2 直线化的标准曲线

(四) 孕酮值

用本法测定了一头秦川牛产后1—10天下午末乳的孕酮水平(图3)。与原方法测定的结果相比,其值没有显著差异(P>0.05)。用本方法测定了3头摩拉水牛产后1

—60天下午末乳的孕酮值。结果表明，在产后期，水牛的乳汁孕酮水平均持续的低（图4）。

讨 论

（一）标准乳的取替

本法用等量的GPBS奶代替标准奶，所建立的标准曲线经Logit直线化后， x' 和 y' 几乎呈完全负相关（ $r = -0.9979$ ），各点的偏离度均在10%以下，其范围是2.8~8.8%（图2）。同原方法直线化的标准曲线相比，不仅拟合度 r 值接近-1，且偏离度较小，说明这样标准的曲线较为理想。

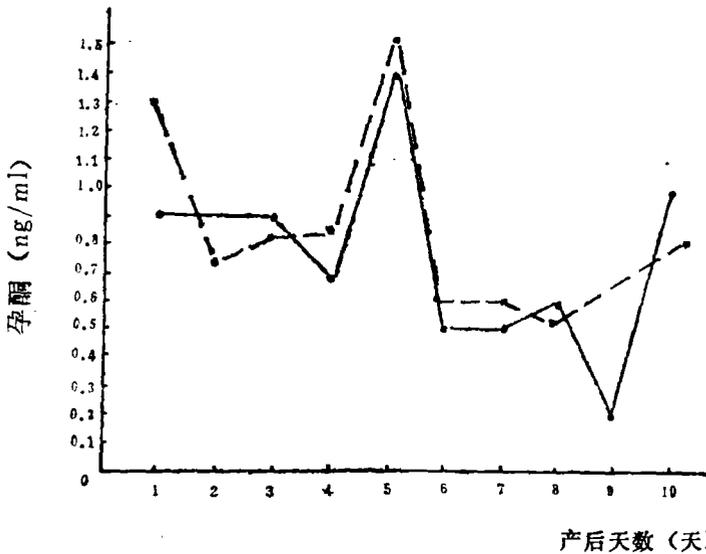


图3 用两种方法所测的46号秦川牛产后1—10天的乳汁孕酮水平
（---原方法，——改进后方法； $P > 0.05$ ）

（二）温育时间与温育温度

实验证明，将原方法的温育温度4℃改为37℃，温育时间由8—16小时改为20分钟，同样能使结合率达到35—50%，从而大大缩短了测定时间。用原方法两天方能完成的测样工作，现仅用1天就可完成。

（三）测定结果

用本法测定了一头秦川牛产后1—10天末乳的孕酮水平，其值与原方法测定的结果没有显著差异（ $P > 0.05$ ）。用本法对3头摩拉水牛产后1—60天奶样的测定结果，孕酮水平均持续的低，其变化类型与文献报道的相近似⁽⁶⁾。

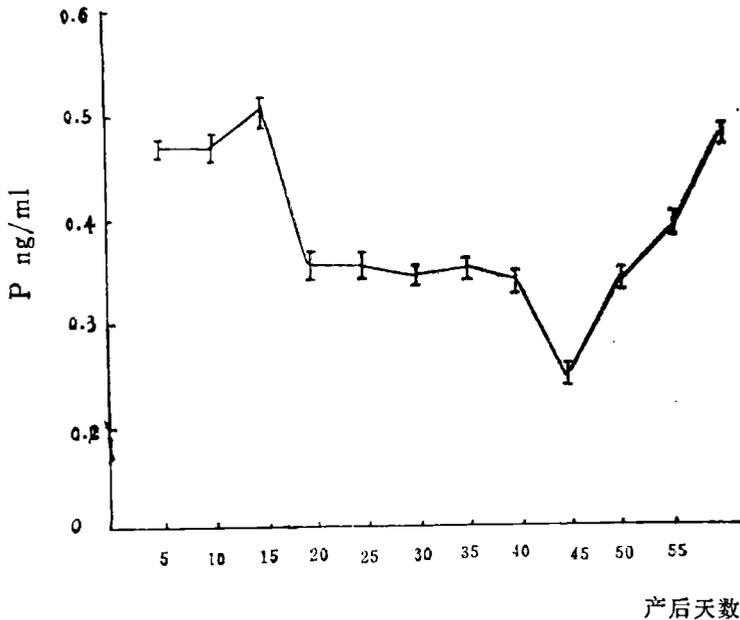


图4 三头摩拉水牛产后期平均孕酮值的变化

参 考 文 献

1. 李永鹏: 乳汁孕酮的放射免疫测定,《西北农学院学报》, 1982(1): 81—88。
2. 李永鹏: 根据乳汁孕酮水平进行奶山羊早期诊断的研究,《畜牧兽医》杂志, 1984(2): 78—94。
3. 李永鹏等: 应用乳汁孕酮的测定进行奶牛的早期妊娠诊断,《畜牧兽医》杂志, 1983(1): 14—18。
4. 焦淑贤等: 测定奶牛孕酮含量进行奶牛早期妊娠诊断的研究,《中国畜牧》杂志, 1983(1): 4—5。
5. Lamming, G.E., and Bulman, D.C.: The use of milk progesterone radioimmunoassay in the diagnosis and treatment of subfertility in dairy cows,《Br. Vet. J.》, 1976, 135(2): 507—517。

Modification of Radioimmunoassay of Progesterone in Milk

Li Yongpeng Geng Guoxia

(Laboratory of Reproductive Endocrine in Domestic Animals,
Northwestern College of Agriculture)

Abstract

The modification of radioimmunoassay of progesterone in milk was described in this paper. It is different from the previous method in those, (1) standardized milk for standard curve tubes was replaced by equivalent gelatine phosphate buffer, (2) the temperature for incubation was changed from 4 °C to 37 °C, and (3) the time for incubation was shortened from 8—16 hours to 20 minutes. The method modified not only had an ideal standard curve, but also shortened the time for measurement. Levels of progesterone in the last milk of Qinchuan cattle and Murrah buffalo were measured by two methods. The levels and patterns of progesterone are similar to those reported in the literatures.