

乳汁 17β -雌二醇放射免疫测定方法的改进

张彦明 弓广智 王建辰*

(西北农业大学家畜生殖内分泌研究室)。

摘 要

本试验发现了乳汁中干扰因素对 17β -雌二醇放射免疫测定方法的影响规律。在标准曲线中设立一个乳汁干扰因素对照点(N_1 管), 计算时用 N_1 管的cpm(每分钟计数)减去与标准曲线Bi管($i=0, 1, \dots, 6$)条件一致的 N_2 管的cpm, 其差数就是乳汁干扰因素所造成的cpm。将cpm加入标准曲线的Bi管中, 这时Bi管内的cpm $[+(N_1-N_2)]$ 与乳汁样品管的cpm条件一致。用标准曲线Bi管校正后的cpm计算出的回归方程, 所求出的乳汁 17β -雌二醇含量很接近其真实含量。

关键词 乳汁; 17β -雌二醇; 放射免疫测定方法

17β -雌二醇($17\beta-E_2$)是卵巢自然分泌的一种生物活性最强的雌激素, 它在维持母畜的雌性特征和正常繁殖过程中起着十分重要的作用。 $17\beta-E_2$ 主要在肝脏中代谢灭活, 从尿中排出, 但还有相当一部分以未灭活的形式进入乳汁中。Turnor^[1]用生物学方法, Lunaas^[2]用荧光分光光度法测定了奶牛乳汁中雌激素的含量。Monk et al.^[3]首次用放射免疫测定法(RIA)测定了奶牛脱脂乳中雌二醇和雌酮的含量, 发现用高度灵敏和高度特异的RIA测出的乳汁雌激素含量比上述方法测出的含量低500—1000倍。Narendran et al.^[4, 5]用类似方法测定了牛和人脱脂乳中 $17\beta-E_2$ 的含量。但所用RIA的主要缺点是脱脂乳中 $17\beta-E_2$ 的含量低(约65—70%的 $17\beta-E_2$ 分布于乳脂中), 使测值不准确或测不出, 或不能直接测出全乳汁中 $17\beta-E_2$ 的含量。Batra et al.^[6]采用给标准曲线各管中加入“无激素乳”(用葡聚糖包膜活性炭液重复处理过的乳汁)的方法直接测定全乳汁中 $17\beta-E_2$ 的含量, 表明乳汁与血中 $17\beta-E_2$ 含量的变化趋势相一致, 但乳汁中的含量比血中高2—3倍。这种方法的缺点是加入“无激素乳”后标准曲线的拟合度不好, 直接影响到测值的准确性。McDonald et al.^[7, 8]对上述方法加以改进, 发展为不经提取而直接测定脱脂乳中 $17\beta-E_2$ 的含量, 但仍克服不了 $17\beta-E_2$ 含量低的缺点。在国内, 张宏伟^[9]首次采用国外的RIA, 测定了奶牛初乳中的雌激素含量。

随着我国奶畜业的发展, 生产中越来越迫切要求研究奶畜在繁殖生理和繁殖病理状

本文于1986年9月23日收到。

• 兽医八六届学生。

况下 $17\beta-E_2$ 的含量变化。与血样测定相比较,奶样易于采集,不需特殊处理,也不会影响生产单位的经济收入。再者,对不孕奶畜人工诱导泌乳所产乳汁中 $17\beta-E_2$ 含量是否会影响吃奶者的健康,口服含有雌激素的避孕药物的哺乳妇女乳汁中的雌激素含量是否对婴儿发育有影响等问题,都急需建立测定全乳汁 $17\beta-E_2$ 含量的方法。

本研究的目的是对以前的方法加以改进,建立起一种操作简单和测值准确的全乳 $17\beta-E_2$ 的放射免疫测定方法。

材 料 和 方 法

1. 乳汁样品 在西北农业大学畜牧场随机选取15只健康、正常分娩后10天的西农萨能奶山羊,1986年2至4月,每4天上午(7:30—9:00)采集中间乳6—10ml,立即装入冰壶中送实验室 -20°C 保存待测。

2. 试剂 ①($6,7-^3\text{H}$) $17\beta-E_2$,上海原子核研究所生产,比放射性为 $39.4\text{Ci}/\text{mmol}$,用无水乙醇配制成 $8000\text{cpm}/12.5\mu\text{l}$ 的工作液;② $17\beta-E_2$ 标准品,上海十二药厂生产,用无水乙醇配制成 $1\text{pg}/\mu\text{l}$ 的工作液;③雌二醇抗血清,上海市内分泌研究所生产,最佳稀释倍数为 $1:20000$,交叉反应性为: $17\beta-E_2$ 100%,雌酮2.5%,雌三醇1.0%,孕酮、17羟孕酮、睾酮及皮质醇均小于0.01%;④无水乙醇,分析纯,西安化学试剂厂生产;⑤0.05M磷酸盐缓冲液(0.05M PBS, PH 7.0),0.1%明胶磷酸盐缓冲液(0.1%GPBS, 0.05M, PH 7.0),1.0%葡聚糖包膜活性炭悬浮液(0.1% DCC)及闪烁液均按本研究室以前的方法进行。

3. 主要仪器 EJ-2100型液体闪烁计数器,西安二六二厂生产,对 ^3H 的探测效率为55%;旋涡混合器,磁力加热搅拌器,康氏振荡器。

4. 操作方法 ①乳汁样品的提取:室温下解冻乳样 $\rightarrow$ 充分摇匀后吸1ml乳汁到10ml具塞刻度离心管中 $\rightarrow$ 加入6ml无水乙醇 $\rightarrow$ 旋涡振荡1分钟,静置1小时左右 $\rightarrow$ 离心10分钟(2000转/分) $\rightarrow$ 吸2ml上清液于相应的反应管中(双管) $\rightarrow$ 置恒温干燥箱中 85°C 烘干(标准曲线管中加入的标准品也同时烘干)。②RIA操作程序见表1。

5. 计算 ①确定标准曲线回归方程:先按表2计算出回归截距 a 、回归斜率 b 及拟合度 r ,再将 a 、 b 值代入直线回归方程 $Y = a + bX$ 中,即得 $Y' = 3.2643 - 2.1229X'$ 。②样品中激素含量的计算:将

$$X(\text{样品 } 17\beta-E_2 \text{ 含量}) = 10 \frac{a + \ln\left(\frac{B_0}{n - N_1} - 1\right)}{-b}$$

输入计算器中,然后每输入一个样品的平均cpm(即 n 值),就可以计算出每管的 $17\beta-E_2$ 含量(pg),再按下列公式求出每毫升乳汁 $17\beta-E_2$ 的含量:

$$\begin{aligned} 17\beta-E_2(\text{pg}/\text{ml}) &= 17\beta-E_2(\text{pg}/\text{管}) \times \frac{\text{提取液量}(6\text{ml}) + \text{乳汁水分}(0.6-0.8\text{ml})}{\text{测定用抽提液量}(2\text{ml})} \\ &= 17\beta-E_2(\text{pg}/\text{管}) \times 3.3(\text{或}3.4) \end{aligned}$$

表1 乳汁17β-E₂ RIA 操作程序

管号	标准品 1pg/μl (μl)		³ H-E ₂ 8000cpm/ 12.5μl (μl)	抽	抗血清 1:20000 (ml)	旋涡振 荡20秒, 4℃反 应10小 时以上, 或者在 33℃水 浴中反 应30分 钟,置 冰浴中 15分终 止反应	1.0%DCC (ml)	康氏振 荡5分 钟,冰 浴15分 钟,40 00rpm 离心5 分钟, 将上清 液倾 倒于盛 有5ml 闪烁液 的闪烁 杯中
T	—	85℃ 左 右 烘 干	12.5	抽	(GPBS0.2)		(GPBS0.5)	
N ₁	2 ml抽提液		12.5	或	(GPBS0.2)		0.5	
N ₂	—		12.5	85℃	(GPBS0.2)		0.5	
B ₀	—		12.5	左	0.2		0.5	
B ₁	5		12.5	右	0.2		0.5	
B ₂	10		12.5	烘	0.2		0.5	
B ₃	20		12.5	干	0.2		0.5	
B ₄	50		12.5		0.2		0.5	
B ₅	100		12.5		0.2		0.5	
B ₆	200		12.5		0.2		0.5	
批间	2 ml抽提液		12.5		0.2		0.5	
样品	2 ml抽提液		12.5		0.2		0.5	

表2 回归截距 (a)、回归斜率 (b) 和拟合度 (r) 计算表

标准曲线 管 号		cpm	平均 cpm	+ (N ₁ - N ₂)	- N ₁	B (%)	X' (lgx)	Y' (logitB)	标准品 回归值*
T	1	8383	8207						
	2	8031							
N ₁	3	1589	1503						
	4	1416							
N ₂	5	156	150						
	6	144							
B ₀	7	2730	2681	4034	2531	(30.81)			
	8	2632							

5pg	9	2340	2320	3673	2170	85.74	0.6990	1.7939	4.93
	10	2299							
10pg	11	2001	2032	3385	1882	74.36	1.0000	1.0648	10.87
	12	2062							
20pg	13	1660	1742	3095	1592	62.90	1.3010	0.5279	19.45
	14	1823							
50pg	15	1244	1251	2604	1101	43.50	1.6990	-0.2615	45.80
	16	1258							
100pg	17	826	846	2199	696	27.50	2.0000	-0.9694	98.70
	18	866							
200pg	19	523	549	1902	399	15.76	2.3010	-1.6762	212.36
	20	575							
a = 3.2643			b = -2.1229			r = -0.9990			

• 标准品回归值要用+ (N₁-N₂) 栏的cpm计算。

结 果

(一) 回收率

将已知量的17β - E₂标准品加入同一样品中, 混匀后的提取与测定方法均与 样品相同, 五批测定的回收率见表3。

表3 乳汁中加入17β - E₂标准品的回收率

乳 汁 量 (ml)	加入17β - E ₂ 标准品 (pg)	回收量 (pg, 已经体积换算)		回 收 率 (%)
		平 均 数	标 准 差	
1.0	50.00	44.86	2.13	89.72
1.0	60.00	47.12	7.90	78.53
1.0	100.00	106.12	3.14	106.12
1.0	120.00	121.64	10.25	101.37
1.0	200.00	189.38	1.00	94.69
1.0	240.00	252.48	45.16	105.20

(二) 精密度

1. 批内变异系数 同一乳汁样品分5份穿插在样品中测定,其变异系数为9.74%。
2. 批间变异系数 同一乳汁样品在8批中分别测定,其变异系数为10.13%。

(三) 标准曲线拟合度

乳汁样品进行了8批测定,其标准曲线拟合度平均为 $r = -0.9984$ 。

(四) 灵敏度

用2倍标准差法计算出8批测定的灵敏度为1.91pg/管。

(五) 乳汁中 17β -E₂的含量

15只西农萨能奶山羊乳汁 17β -E₂含量为:2月份 60.24 ± 32.93 pg/ml;3月份 64.58 ± 38.69 pg/ml;4月份 67.47 ± 36.14 pg/ml。

讨 论

1. N₁管的意义

N₁管与乳汁样品管相同之处是既有乳汁的抽提物,又加有0.1%明胶磷酸盐缓冲液,其不同之处是没有加入雌二醇抗血清。所以,N₁管的cpm反映了乳汁干扰因素(经研究主要是乳脂)和明胶磷酸盐缓冲液所造成的非特异性结合的程度。那么,N₁管的cpm减去N₂管的cpm(GPBS造成的非特异结合和本底值等造成的计数)就是乳汁干扰因素造成的计数。标准曲线B₁管中没有加入乳汁抽提物,只受GPBS等的影响。因此,将N₁-N₂的cpm分别加到标准曲线B₁管原cpm中之后,B₁管就相当于受到了乳汁干扰因素的影响,这时B₁管cpm[+(N₁-N₂)]就与乳汁样品管的cpm条件一致了,用标准曲线B₁管校正后的cpm计算出的回归方程所求出的样品 17β -E₂含量就很接近真实含量,所以乳汁中加入 17β -E₂的回收率高。

2. 设N₁管应注意的问题

①N₁管所用的乳汁必须是每个课题所采奶样的混合样,即用随机抽样法抽出能够代表整体的奶样(以样品总数的 $1/5-1/3$ 为宜),从每个抽出的样品中吸出1ml乳样(吸前必须摇匀),将其充分混匀后再分装到小瓶中(4-5ml/瓶),每测一批样品时拿出一瓶,其中1-2ml供N₁管用,1ml供批间样用。

②由于受乳汁干扰因素的影响,N₁管双管的cpm有时差异较大。为了减小误差,每个标准曲线中可设2个以上N₁管(指双管),其平均cpm会更真实地反映乳汁干扰因素的程度。再者,在正式测样前,可以对N₁管进行专门测定,即在标准曲线中设10个以上N₁管(双管)和2-4个N₂管,求出N₁-N₂的平均cpm,以此cpm代表全部乳汁样品的干扰程度。这样,在遇到某一批测定中N₁单管cpm差异太大时,就可将其中N₁-N₂的cpm偏离平均N₁-N₂的cpm较大的单管去掉,以保证每批测定中N₁管cpm的正确性。

3. 减小乳汁样品(包括N₁管)测定误差的办法

①由于乳汁 17β -E₂RIA中的主要干扰因素是乳脂, 17β -E₂也主要分布于乳脂中,所以,提取时必须将乳样摇匀后再取1ml于提取管中。

②虽然在提取过程中乳脂均匀分布于提取液中,但离心后有部分乳脂浮于抽提液最

上层,故最好将2 ml 定量取液器垂直固定,分装时将取液尖插入抽提液中部吸取,以减少双管中乳脂量不同而造成 cpm 的差异。

4. 关于灵敏度的问题

本文采用2倍标准差法计算灵敏度。在乳汁 $17\beta - E_2$ 测定中,也可用水空白值代表灵敏度,但需要注意的是,因水空白管中没有加入乳汁抽提物,其 cpm 也需加上 $N_1 - N_2$ 的 cpm 后才能计算水空白值。

结 论

1. 本方法的成功之处在于,发现了乳汁干扰因素对 $17\beta - E_2$ 放射免疫测定的影响规律,不必给标准曲线B₁管中加入“无激素乳”,也无须将乳汁脱脂后测定,而巧妙地在标准曲线中设立一个乳汁干扰因素对照点(N_1 管),以此将标准曲线B₁管的 cpm 校正成与样品管的 cpm 条件一致,因而回收率高,测值准确,可靠。

2. 与国外现有方法相比较,本方法的优点是:

①不经脱脂而直接测定出全乳汁 $17\beta - E_2$ 的含量,这样不会因脱脂乳中 $17\beta - E_2$ 含量很低造成测值不准确或不可测。

②乳汁中加入 $17\beta - E_2$ 标准品回收率高(现有方法均为脱脂乳中加入 $17\beta - E_2$ 标准品回收率),不仅测值准确,而且含量很低的样品也可测出。

③标准曲线不受无激素乳的影响,因而拟合度好,由此计算出的样品激素含量准确。

④本方法也适用于乳汁其他类固醇激素的放射免疫测定。

⑤操作简单,节约试剂和时间,易于在科研和生产中应用。

参 考 文 献

- [1] Turner, C. W.: Estrogen content of colostrum and milk of dairy cattle, *J. Dairy Sci.*, 41, 1958: 630.
- [2] Lunass, T.: Transfer of oestradiol- 17β to milk in cattle, *Nature*, 198, 1963: 638.
- [3] Monk, E. L. et al.: Relationships between immunoreactive estrone and estradiol in milk, blood, and urine of dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 58(1) 1975: 34—40.
- [4] Narendran, R. et al.: Hormonal induction of lactation: estrogen and progesterone in milk, *J. Dairy Sci.*, 62(7) 1979: 1069—1075.
- [5] Wolford, S. T. and Argoudelis, C. J.: Measurement of estrogens in cows milk, human milk, and dairy Products, *J. Dairy Sci.*, 62 (9) 1979: 1458—1463.
- [6] Batra, S. K. et al.: Quantitative relationships between oestradiol- 17β in the milk and blood of lactating buffaloes, *J. Endocr.*, 84 (1) 1980:

205—209.

- [7] McDonald, B. J. et al.: Direct radioimmunoassay of estradiol— 17β in defatted bovine milk, *Steroids*, 39 (6) 1982; 711—721.
- [8] McDonald, B. J. et al.: Oestradiol— 17β profiles in defatted bovine milk as determined by direct radioimmunoassay, *British Veter.J.*, 138(5)1982; 449—453.
- [9] 张宏伟: 奶牛初乳所含孕酮和雌激素含量的放免分析, 《东北农学院学报》, (4)1985; 13—16.

IMPROVEMENT OF RADIOIMMUNOASSAY OF ESTRADIOL- 17β IN MILK

Zhang Yanming Gong Guangzhi Wang Jianchen
(Domestic Animal Reproductive Endocrine Laboratory,
Northwestern Agricultural University)

Abstract

The law of interference factors affecting radioimmunoassay of estradiol— 17β in milk was found in this experiment. A controlled point (N_1) for interference factors in milk was set up at the same standard curve. In calculating, difference between cpm in N_1 tubes (counted by per minute) minus cpm in N_2 tubes with the same conditions as B_i tubes ($i=0, 1, \dots, 6$) at the standard curve was the cpm caused by interference factors in milk. When this 'cpm' was added to B_i tubes of standard curve, the cpm in B_i tubes [$+(N_1 - N_2)$] was agreeable with the same conditions of the cpm in milk sample tubes. Thus, concentration of estradiol— 17β in milk measured by radioimmunoassay was almost near to its true concentration.

Key Words milk, estradiol— 17β ; radioimmunoassay