

鲤促性腺激素放射免疫测定方法的改进

——聚乙二醇的应用

王育西 潘家秀

(中国科学院上海生物化学研究所)

蒋茂松

(上海华东医院)

提 要

本文报道一种快速的鲤促性腺激素放射免疫测定法。用微晶纤维素提纯¹²⁵I-促性腺激素和采用聚乙二醇分离游离的和与抗体结合的抗原。

鲤,与四大家鱼(青、草、鲢、鳙)不同,是在池塘中能自然产卵的鱼,研究它在性周期不同阶段血液中促性腺激素(以下简称GTH)的含量,有着重要的意义。为此曾建立放射免疫双抗体测定法^[1]。为了适应在短暂的产卵季节及时了介GTH变化的需要,本文再介绍一种改进的方法,即以微晶纤维素代替葡聚糖凝胶分离¹²⁵I标记的GTH和采用聚乙二醇(以下简称PEG)沉淀抗原、抗体复合物,一次测定可在1½—2天内完成,而双抗体法需时3—4天。灵敏度与双抗体法相近。

材 料

PEG 6000: 上海合成洗涤剂二厂产品,奉贤光明化工厂加工。

鲤垂体GTH: 分离提纯方法见[1]。

免抗鲤垂体GTH免疫血清: 制备方法见[1]。以自身取代法^[4]测定亲和常数 K_a 为 $1.2 \times 10^{10} \text{L/M}$ 。

方法和结果

(一) GTH ¹²⁵I 标记和纯化

在反应管中依次加0.2M、pH7.5的磷酸缓冲液20微升,以0.05M、pH7.5的磷酸缓冲液稀释的Na ¹²⁵I 1毫居里(100微升),GTH 5微克(25微升)和0.8%氯胺-T 12.5

微升。反应3分钟后,再加0.48%偏重亚硫酸钠50微升,反应1分钟。碘化结束后,将反应液加于以0.07M、pH8.6巴比妥缓冲液润湿的微晶纤维素CF11柱(1×1厘米),以同一缓冲液洗脱游离的 $\text{Na } ^{125}\text{I}$ 和损伤的GTH,洗脱液约需15毫升。然后换含3%的卵白蛋白的0.05M、pH7.5磷酸缓冲生理盐水(后者以下简称PBS)洗脱 ^{125}I -GTH。每管收集0.5毫升,在井型计数器测cpm数。取cpm数最高的数管作放射免疫测定用。

为比较微晶纤维素和葡聚糖凝胶G-50的分离效果,按文献[1]中所述方法,同时进行 ^{125}I -GTH的纯化。

分别以微晶纤维素分离的 ^{125}I -GTH(C- ^{125}I -GTH)和葡聚糖凝胶分离的 ^{125}I -GTH(S- ^{125}I -GTH)用双抗体法作标准曲线,二者平行(图1),C- ^{125}I -GTH的稍高。说明微晶纤维素分离法适用于鲤GTH的放射免疫测定。

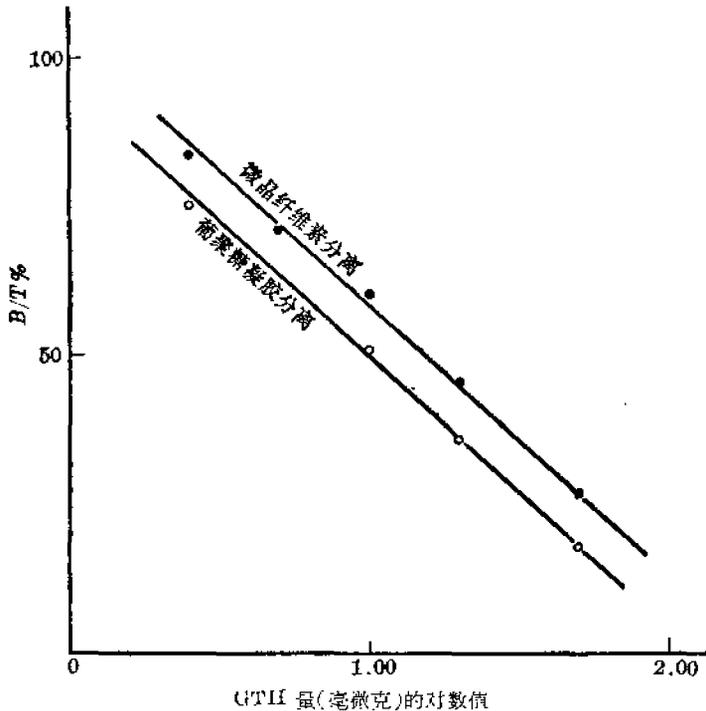


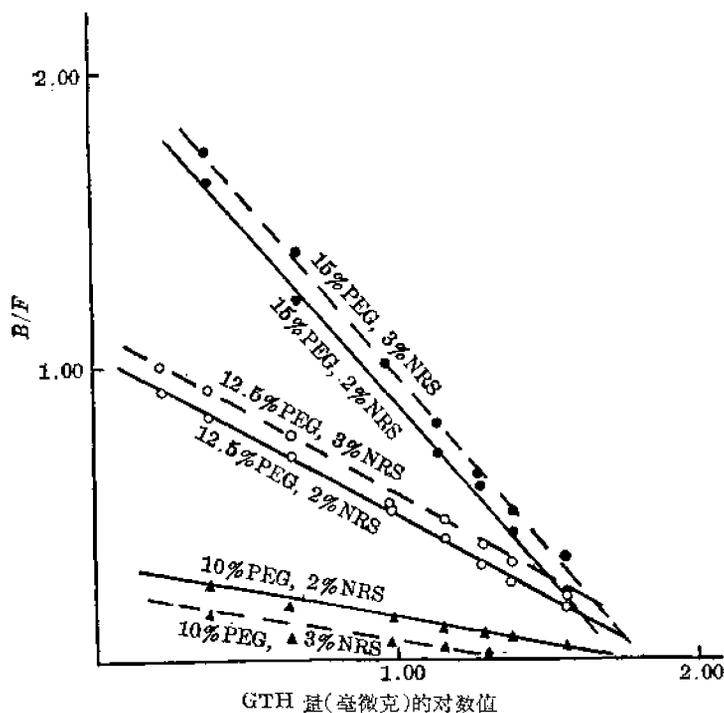
图1 用C- ^{125}I -GTH和用S- ^{125}I -GTH所作的标准曲线(双抗体法)

(二) PEG法工作条件的确定

1. PEG和正常兔血清浓度分6组进行(表一),每组各管分别加0.1M EDTA-PBS100微升,含10%或15%正常兔血清(以下简称NRS)的PBS400微升,使NRS的终浓度为2%或3%(以下若不注明原始液浓度,则指终浓度),不同毫微克数的标准GTH和PBS共300微升,兔抗GTH免疫血清(原液浓度1:1,000)100微升,C- ^{125}I -GTH100微升(约8000cpm),4°C温育18小时,测cpm数(T值)。加1毫升原液浓度为20%、25%或30%的PEG,用力充分摇匀,3500转/分钟离心20分钟。去上清,测cpm数(B值)。计算B/F,以B/F对标准GTH毫微克数的对数值作图(图2)。由图可见以第六组的

表1 各组 NRS 和 PEG 的浓度

组 别	NRS		PEG	
	原 始 浓 度(%)	终 浓 度 (%)	原 始 浓 度(%)	终 浓 度 (%)
一	10	2	20	10
二	15	3	20	10
三	10	2	25	12.5
四	15	3	25	12.5
五	10	2	30	15
六	15	3	30	15

图2 PEG 和 NRS 浓度对 B/F 值的影响(4°C温育 18 小时)

沉淀最完全。第一、二组沉淀最少, 这二组的条件不宜作放射免疫测定用。

2. 温度和时间 按上述条件操作, 10°C温育 3 小时, 以 B/F 对 GTH 毫微克数的对数值作图, 与 4°C温育 18 小时的比较。第一、二组的斜率下降, 第三、四组的略低, 第五、六组稍高。灵敏度均不如 4°C温育 18 小时的第六组(图 2、图 3)。

3. “弯钩效应” 4°C温育 18 小时, PEG 15%, NRS 2% 或 3%, 标准 GTH 在 2.4 毫微克以下, 有显著的“弯钩效应”; 10°C温育 3 小时, PEG 15%, NRS 3%, 标准 GTH 在 1.2 毫微克以下, 才有“弯钩”出现, NRS 2%者无“弯钩”; PEG 10%或 12.5%, NRS 2%或 3%, 4°C温育 18 小时或 10°C温育 3 小时, 也均无“弯钩”(图 4)。为避免“弯钩”的影响, 在测定样品时, 应选用 GTH 在 7 毫微克以上的线段。若在反应液中加 7 毫微克 GTH, 所测范围可扩大到 7 毫微克以下。

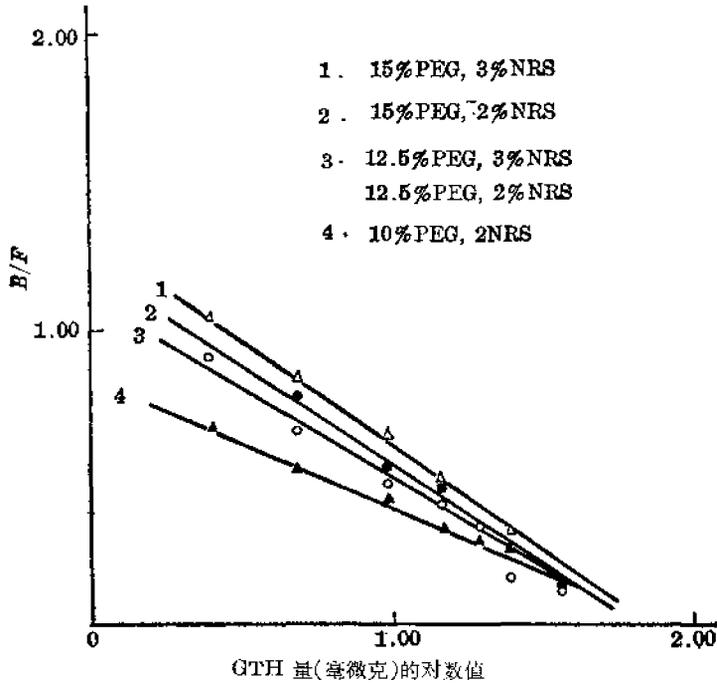


图3 PEG 和 NRS 浓度对B/F值的影响(10°C 温育3小时)

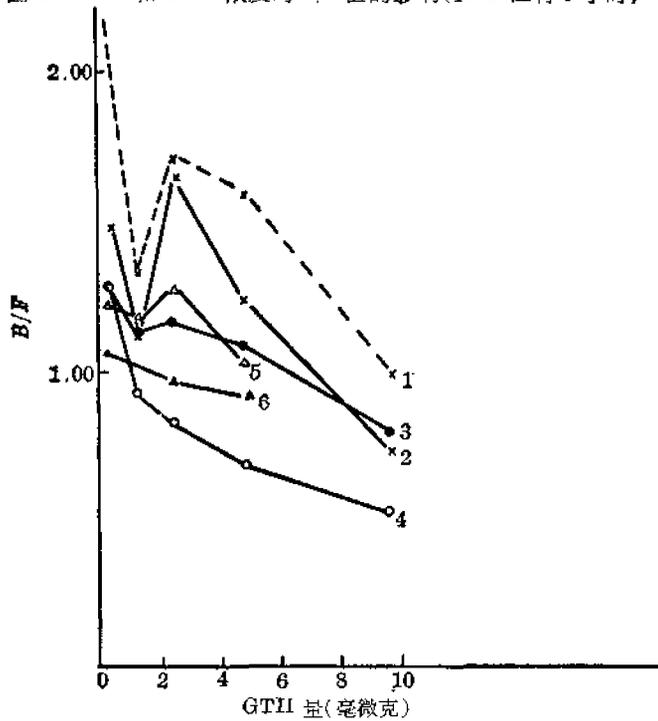


图4、几种不同条件下的“弯钩效应”

(1)PEG 15%, NRS 3%; (2)PEG 15%,NRS 2%, 4°C温育18小时; (3)PEG 12.5%, NRS 3%; (4)PEG 12.5%, NRS 2%, 4°C温育18小时; (5)PEG 15%, NRS 3%; (6)PEG 15%, NRS 2%,10°C温育3小时

4. 非特异沉淀 方法同1., 但不加标准 GTH 和免疫血清。PEG 在 12.5% 以内, 无论 NRS 是 2% 或 3%, 非特异沉淀的 B/F 值在 0.1 以内, 变化不大。当 PEG 达 15%, 非特异沉淀量稍有增加, B/F 为 0.12。4°C 温育 18 小时比 10°C 温育 3 小时, 数值稍低。参看图 5。由于非特异沉淀可能是标记抗原与抗原、抗体复合物发生共沉淀所致, 可将标记抗原以 15% PEG 预处理 (0.1 毫升标记抗原加等体积的 30% PEG), 再作测定, 其数值较不经预处理的略低 8—14%, 与双抗体法测得值基本相同。

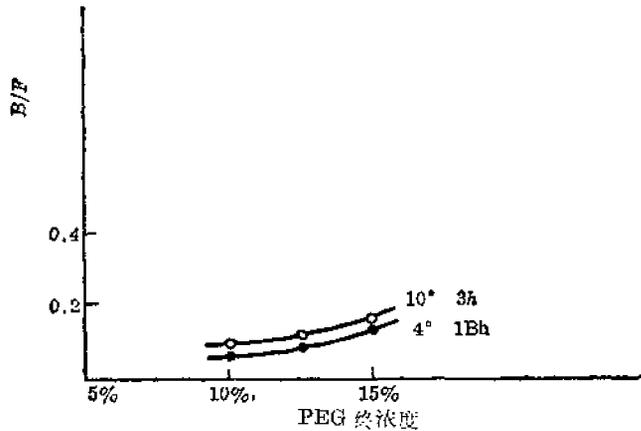


图 5、PEG、NRS 浓度与非特异沉淀

5. 过量免疫血清与标记抗原的结合率 50 微升免疫血清与 50 微升 PBS 混合后测定与 $C-^{125}I-GTH$ 1 约 8000cpm) 的结合率, 方法同 1。在 PEG 15%、NRS 3% 条件下, 4°C 温育 18 小时, 结合率 (B/T) 为 88%; 10°C 温育 3 小时, 结合率 (B/T) 为 84%。与双抗体法的结合率相近。

6. 标准曲线 根据以上结果, 4°C 温育 18 小时 PEG 15%、NRS 3%、测定的灵敏度较高, 非特异沉淀率低, 因此即采用此条件作标准曲线, 同时与双抗体法标准曲线, 进行比较。两种方法所用的标记 GTH、标准 GTH 和缓冲液均为同一批配制。结果二者曲线几近平行, PEG 法的略高 (图 6)。双抗体法相关系数为 -0.993, 标准误差 ± 0.07 , 斜率 -1.12; PEG 法相关系数为 -0.993, 标准误差 ± 0.07 , 斜率 -1.11。

(三)、鲤血清 GTH 含量的测定

11 月份鲤 (昆山水产养殖场) 6 条, 自心脏抽血, 用 PEG 法测定血清 GTH 含量, 条件是:

0.1mEDTA-PBS 100 微升, 含 15%NRS (原液浓度) 的 PBS 400 微升, 不同毫微克数的标准 GTH 或血清样品和 PBS 共 300 微升, 兔抗 GTH 免疫血清 (原液浓度 1:1000) 100 微升, $C-^{125}I-GTH$ (约 8000 cpm) 100 微升, 4°C 温育 18 小时, 测总 cpm 数。加 30% (原液浓度) PEG 1 毫升, 用力充分摇匀, 3500 转/分钟, 离心 20 分钟, 去上清, 测 cpm 数。从 B/F 值计算 GTH 含量。结果 6 条鲤血清中 GTH 含量在 15—74 毫微克/毫升血清, 其中 1 条是雄鱼, GTH 含量最高 74 毫微克/毫升血清。

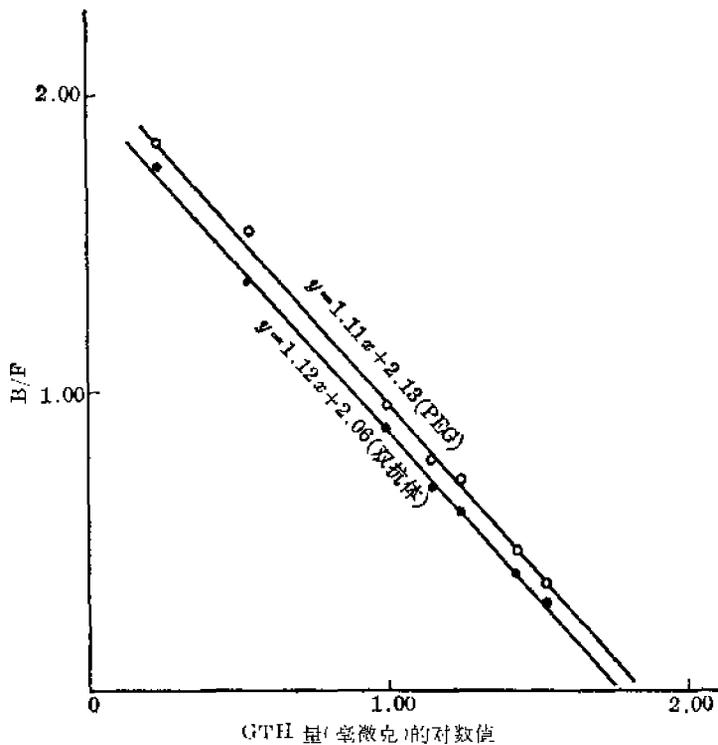


图6、PEG法和双抗体法标准曲线的比较

讨 论

微晶纤维素作为分离 GTH 碘标记物,有良好的效果。游离 $\text{Na } ^{125}\text{I}$ 和损伤蛋白在低离子强度和较高的 pH 不被吸附, ^{125}I -GTH 则以高浓度的蛋白质解吸收集。为解吸黄体生成素(LH)等多用牛或其他动物血清^[8],本文用卵白蛋白,获得成功。

PEG 法分离游离的和与抗体结合的抗原,优点是免去了第二抗体的制备和在双抗体法中加第二抗体后的长时间保温。加 PEG 后只须在室温反应片刻,即可离心分离,方便而快速。PEG 的作用机制^[9]尚未阐明。蛋白质被 PEG 沉淀与 PEG 分子量的大小有关。一般来说 PEG 6000 是合适的。至于 PEG 的浓度,必须寻找使抗原、抗体复合物沉淀最多,游离抗原共沉淀最少的条件。小分子抗原如胰岛素、加压素、血管紧张素^[2], 12.5% PEG 即足以使抗原、抗体复合物沉淀几近完全,而游离抗原保持溶解状态,很容易分开。高分子蛋白质抗原,则必须测定游离抗原与抗原、抗体复合物发生明显的共沉淀时的 PEG 浓度,为分离用的 PEG 浓度,当在此之下。例如血清白蛋白^[6], PEG 浓度高于 15% 时,血清白蛋白共沉淀明显,虽然抗原、抗体复合物沉淀量大于 90%,此时只能采用 15% PEG。此外,还必须加正常羊血清、正常兔血清或 γ -球蛋白,否则即使 PEG 浓度达 15%,也不能使抗原、抗体复合物沉淀^[2]。为鲤 GTH 的放射免疫测定,PEG 用 15%, NRS 用 3%,效果最好。

曾有报导^[5,9], LH、滤泡生成素(FSH)、人绒毛膜促性腺激素(HCG)用双抗体法作

标准曲线时,常见到“弯钩”效应,第一抗体血清浓度高时益为明显。鲤 GTH 放射免疫测定,在 PEG 浓度高、反应时间长、标准 GTH 加量微少时,“弯钩”显著,双抗体法也有这种现象。因此,促性腺激素放射免疫测定中,无论是 PEG 法或双抗体法,出现“弯钩”效应,似为一种普遍现象。许多作者用协同作用^[7,9]来解释,并有一定实验基础,如何进一步从理论上研究,当是有意义的问题。

参 考 文 献

- [1] 厦门水产学院鱼类生殖生理科研小组、中国科学院上海生物化学研究所多肽激素组, 1978. 鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 血液中促性腺激素放射免疫测定. *生物化学与生物物理学报*, **10**:399—407.
- [2] Desbuquois, B. and Aurbach, G. D., 1971. Use of polyethylene glycol to separate free and antibody bound peptide hormones in radioimmunoassay. *J. Clin. Endoc.* **33**: 732—738.
- [3] Franchimont, P. et al., 1974. Radioimmunoassays of glycoprotein hormones. *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine*, 1973, **1**: 195—210.
- [4] Gocke, D. J. et al., 1969. Physiological and pathological variations of plasma angiotensin II in man. *Circul. Res.* **24 Suppl.** **1**: 131—146
- [5] Joel, E. W. et al., 1974. Problems of optimization of double antibody radioimmunoassay of LH, HFSH and HGH “Hook” phenomenon, falsed negative patient values and linearity of values from patient plasma dilutions. *Radioimmunoassay and Related procedures in Medicine*, 1973, **1**: 45—58.
- [6] Kida, S. Muller-Eberhard, U., 1975. A radioimmunoassay employing polyethylene glycol (PEG) for measuring dilute concentrations of rat hemopexin, albumin and haptoglobin. *Immunochem.* **12**: 97—99.
- [7] Niederer, W., 1974. The interpretation of paradoxical radioimmunoassay standard curves. *J. Immunol. Methods*, **5**: 77—82.
- [8] Polson, A. 1977., A theory for the displacement of proteins and viruses with polyethylene glycol. *Prep. Biochem.* **7**: 129—154.
- [9] Weintraub, B. D. et al., 1973. Apparent cooperativity in radioimmunoassay of human chorionic gonadotropin. *Endoc.* **92**: 1250—1255.

AN IMPROVED METHOD FOR THE RADIOIMMUNOASSAY OF CARP GONADOTROPIN

Wang Yuxi and Pan Jiaxiu

(*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica*)

Jiang Maosong

(*Huatong Hospital, Shanghai*)

Abstract

A rapid method for the radioimmunoassay of carp gonadotropin is developed by using (1) PEG to separate the free and antibodybound antigen and (2) crystalline cellulose to purify the labelled gonadotropin. In comparison with the double antibody method, the new procedure is much less time-consuming.