

# 一种快速、可靠的性甾体激素放射免疫测定法

刘 以 训

(中国科学院动物研究所内分泌室)

性甾体激素放射免疫测定方法已有大量报道。我们在爱克斯勒 (Exley)<sup>[1]</sup> 等人方法的基础上, 经多年改进, 发展了一种方便、可靠的放射免疫测定方法。实践证明, 用同一缓冲液, 同一分离试剂, 同一温育时间和同样操作步骤, 可测定雌二醇、雌酮、孕酮和睾酮。温育时间只需 20 分钟。一个技术人员一天之内可测定 50 几个样品。本方法对雌二醇和雌酮的最低可测量为 5—10 微微克; 对孕酮和睾酮的最低可测量为 25 微微克以下; 提取回收率一般为 70—90%。组内和组间变异系数随技术人员的操作熟练程度有某些差异, 但一般是在允许的范围

内变动。

## (一) 试剂配制、贮藏和使用

### 1. 放射免疫测定 (RIA) 缓冲液

NaCl <sub>2</sub>	2 克
KCl	0.5 克
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	0.725 克
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 克
NaN <sub>3</sub>	0.2 克
明胶	0.2 克(加热溶解)
重蒸水	200 毫升

pH7.2—7.4, 4°C 贮藏, 在一个月之内是稳定的。

## 2. 活性碳——葡聚糖悬浮液 (D/C)

活性碳 0.2 克

葡聚糖 (T<sub>70</sub>) 0.02 克

RIA 缓冲液 40 毫升

充分混合均匀后,存 4°C 贮藏,一周之内是稳定的。

## 3. 甾体激素标准液

雌二醇/雌酮标准液 2 毫微克/毫升

孕酮标准液 8 毫微克/毫升

睾酮标准液 8 毫微克/毫升

上述水溶液均应贮藏在 4°C 环境中,2 天之内没有明显改变,但应注意不能冰冻保存。

## 4. 甾体激素抗血清

(1) 雌激素抗血清:由动物研究所内分泌室用进口优质抗原免疫家兔所制备<sup>[2]</sup>,可测定血清或血浆中雌二醇和雌酮总量;如将提取样品经葡聚糖 LH<sub>20</sub>(Sephadex LH<sub>20</sub>) 凝胶柱层析分离后,可分别测定雌二醇和雌酮含量。抗体灵敏度高,最低可测量为 5—10 微微克;抗体最终稀释度为 1:200,000—1:350,000(结合率为 55—40%);抗体与雌酮的交叉反应为 80—95%;对雌三醇交叉反应为 0.7—1%,对其他有关甾体的交叉反应皆小于 0.1%。

(2) 孕酮抗血清:由国外进口抗原免疫家兔所得<sup>[3]</sup>。抗血清与 16-氢孕酮交叉反应为 5%;与脱氧皮质酮为 4%;与 17 羟孕酮小于 0.3%;与其他有关甾体的交叉反应小于 0.1%。当抗体最终稀释度为 1:100,000—1:122,500 时(结合率为 55—40%),最低可测量为 10—25 微微克。最近经世界卫生组织初步鉴定,本抗血清为优质产品,准备采用装配世界卫生组织标准孕酮放射免疫测定药箱之用。

(3) 睾酮抗血清:由进口抗原免疫家兔

所得;其最终稀释度为 35,000 时(结合率为 55—40%),最低可测量为 10—25 微微克。

## 5. 甾体标记物

[2,4,6,7<sup>3</sup>H(n)]-雌二醇-17 $\beta$ (106 居里/毫克分子): The Radiochemical Centre, Amersham England;

[1,2,6,7<sup>3</sup>H]-孕酮(82 居里/毫克分子), The Radiochemical Centre, Amersham England. [1,2<sup>3</sup>H]-睾酮(36 居里/毫克分子),上海原子核研究所产。

## 6. 闪烁液

甲苯闪烁液:2(4 叔丁基苯基)5-(4 联苯基)噁唑(1,3,4)(PPO)5 克,甲苯 1000 毫升。

除闪烁液外,上述整套试剂已由动物研究所内分泌室装配成雌激素、孕酮和睾酮放射免疫测定药盒,供全国使用。

## (二) 试剂稀释方法

现以动物研究所内分泌研究室测定药盒为例说明。

RIA 缓冲液:将 A(4 种盐)和 C(明胶)瓶的内含物倒入 200 毫升试剂瓶中,加 50—100 毫升重蒸水,在 80—90°C 水浴锅中放置 5—10 分钟,等明胶完全溶解后,加重蒸水到 200 毫升,将 B 瓶的 NaN<sub>3</sub> 再加入,其 pH 值应为 7.2 左右。

D/C 悬浮液:用一定量 RIA 缓冲液分别将葡聚糖和活性碳溶解后,合并在一起,然后加 RIA 缓冲液到 40 毫升,室温下搅拌 2—3 小时待用。

甾体激素标准液:雌二醇-17 $\beta$  和雌酮标准液:瓶中各加 2 毫升 RIA 缓冲液,其浓度分别为 200 微微克/0.2 毫升。用 RIA 缓冲液分别稀释为 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 微微克/0.2 毫升。

孕酮和睾酮标准液:瓶中各加 2 毫升 RIA 缓冲液,其浓度分别为 800 微微克/0.2 毫升。用 RIA 缓冲液稀释为 800, 400, 200, 100, 50, 25 微微克/0.2 毫升。

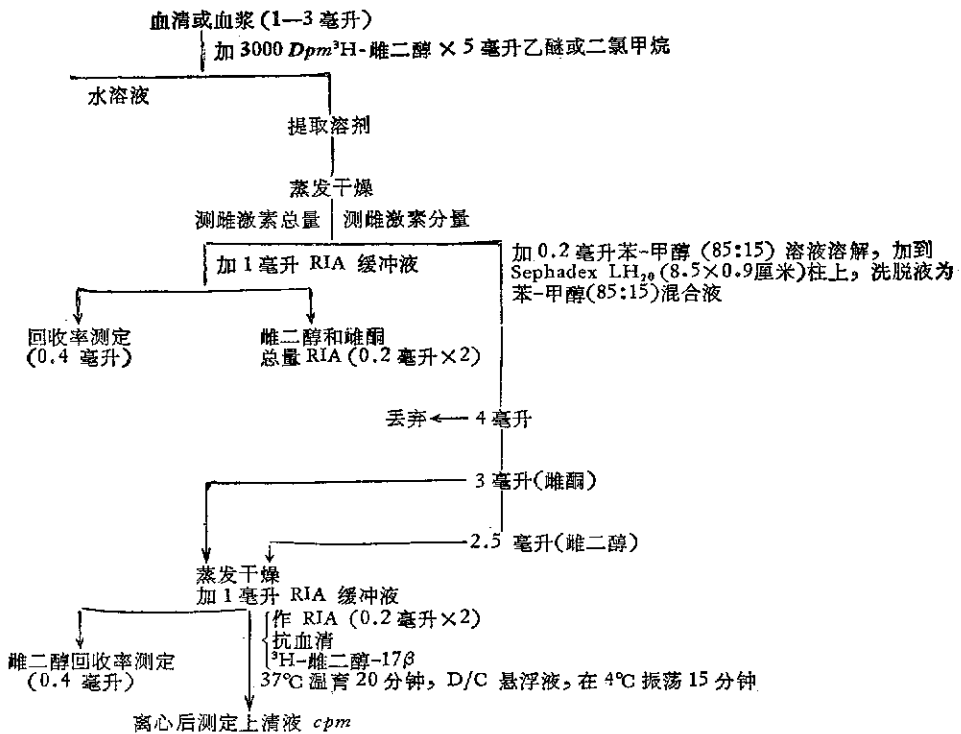


图1 雌二醇和雌酮分离及 RIA 图解

**甾体标记物:** RIA 药盒中的标记物( $^3\text{H}$ -雌二醇,  $^3\text{H}$ -孕酮或  $^3\text{H}$ -睾酮)用 RIA 缓冲液稀释为 6—7 毫升, 使其在 50 微升中含大约 18000 Dpm<sup>1)</sup>。

### (三) 实验步骤

1. 提取和回收率校正 一般说来, 乙醚对雌激素、孕酮和睾酮是一种较好的提取溶剂。有人认为二氯甲烷对雌激素提取效果最好, 而石油醚对孕酮的提取效率最高。无论采用那种溶剂, 用前一定经过适当处理。

在实验过程中, 如果回收率稳定, 可省略各样品都作回收率的检查步骤。为了代表性地检查和估计每次提取过程中回收率的情况, 可作 2—4 管回收率检查。作法如下: 在提取管中加入与待提取样品等量的血清或血浆, 加入大约 5000 cpm  $^3\text{H}$ -甾体, 室温下静放 20 分钟, 其他操作与样品管完全相同。提取溶剂干燥后, 加 0.5 毫升 RIA 缓冲液; 各取 0.2 毫升 (双管) 作回收率测定, 回收率 % = (所测回收率管的 cpm 平均值  $\times 2.5$ ) / (所加入的  $^3\text{H}$ -甾体 cpm 总计数)  $\times 100$ 。

对样品的一般提取步骤如下:

按标准曲线范围在各提取管中加一定量血清 (或血浆), 然后加大约 3000 cpm  $^3\text{H}$ -甾体, 在室温下静放 20 分钟, 加 5 倍样品体积的提取溶剂 (乙醚、二氯甲烷或石油醚), 在震荡器上提取 10—15 分钟。经适当方法将提取溶剂和水溶液分离后, 将溶剂移入闪烁杯或靛霉素瓶中, 在水浴锅中加热蒸发干燥, 加 1 毫升 RIA 缓冲液, 充分溶解后, 取 0.4 毫升作样品的回收率测定; 取双份 0.2 毫升作激素含量测定。

### 2. 雌二醇和雌酮的分离

称取 2 克葡聚糖 LH<sub>20</sub>, 加 10 毫升苯: 甲醇 (85:15) 混合液, 浸泡 2—5 分钟, 装入 8.5  $\times$  0.9 厘米柱中, 柱压紧后, 将提取样品上柱, 用苯-甲醇 (85:15) 混合液洗脱, 将前 3 毫升洗脱液弃掉, 加 2.5 毫升过柱收集 (雌酮); 再加 3.5 毫升过柱收集 (雌二醇)。上述指标仅供参考。在本测定药盒中提供了  $^3\text{H}$ -雌酮, 在样品分离前用者可自己检查雌酮和雌二醇洗脱

1)  $dpm = cpm / \sigma$ ,  $cpm$ ——每分钟脉冲数;  $\sigma$ ——仪器测定效率。

表 1 雌二醇、孕酮和睾酮 RIA 实验设计方案

管序	管号	标准或样品稀释液 (毫升)	RIA 缓冲液 (毫升)	<sup>3</sup> H-当体 (毫升)	抗血清稀释液 (毫升)	D/C 悬浮液 (毫升)
1—2	总计数管 (T)	—	0.3	0.05	—	*
3—4	非特异性结合管 (N)	—	0.3	0.05	—	0.3
5—6	溶剂空白管 (B)	—	0.2 (溶剂提取液)	0.05	0.1	0.3
7—8	最大结合管 (O)	—	0.2	0.05	0.1	0.3
9—20	标准曲线管	0.2	—	0.05	0.1	0.3
21—26	质量控制管	0.2	—	0.05	0.1	0.3
27—	样品管	0.2	—	0.05	0.1	0.3

\* 离心前向 T 管中加 0.3 毫升 RIA 缓冲液。

出的位置。作法如下：取 5000—10000cpm <sup>3</sup>H-雌二醇和 <sup>3</sup>H-雌二醇，将其混合，蒸发干燥后，加 0.2 毫升苯-甲醇 (85:15) 混合液，使其溶解上柱，用苯-甲醇 (85:15) 混合液洗脱，0.5 毫升收集于闪烁杯中，加入闪烁液后测定其 cpm，第一峰值为雌酮，第二峰值为雌二醇。

操作步骤 (见图 1)。

### 3. 溶剂空白检查

取 5—10 毫升提取溶剂，蒸发干燥，加 0.5 毫升 RIA 缓冲液，取双份 0.2 毫升随同样品作空白值检查，空白值应在 B<sub>0</sub> 值 95% 可信限之内。如空白值过高，不应从样品测定值中扣减以作校正，应对溶剂作进一步处理。

### 4. 质量控制检查

在每次实验中，应包括 2—3 对质量对照血清，血清样品可采用分装后在 -20℃ 保存的库存血。在处理 and 操作过程中一切步骤应同样品管完全相同。

### 5. 样品测定

除有特殊说明，一切操作皆在 0℃—4℃ 进行。按照下表 (表 1) 加入样品或标准品，然后

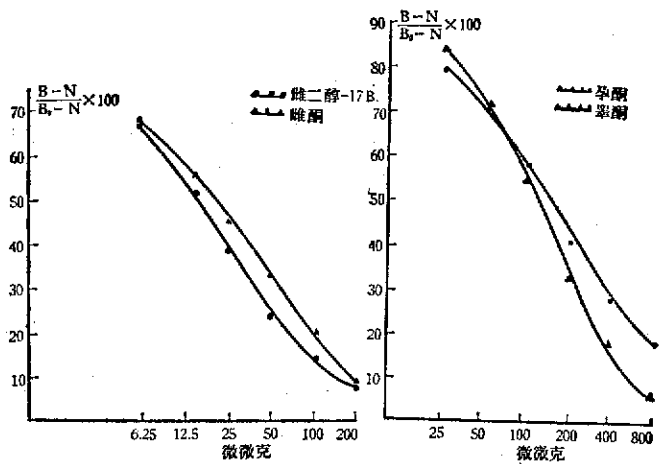


图 2 雌二醇-17β 和雌酮标准曲线

图 3 孕酮和睾酮标准曲线

加入样品或标准品，再加入标记物和抗体，混合均匀后，置 37℃ 水浴中 20 分钟，移至冰水中 5—10 分钟终止反应，迅速加入 300 微升葡聚糖-活性碳悬浮液 (应不停地搅拌)，振荡 5—10 分钟，3000 转/分离心 5—10 分钟，将上清一次倒入闪烁杯中，加 5 毫升甲苯闪烁液 (ppo 5 克，甲苯 1000 毫升)，暗处放置 4—6 小时后测定每分钟记数 (cpm)。

### (四) 标准曲线和样品含量计算

1. 求出 T 管 cpm 的平均值 (T)；

2. 求出  $N$  管  $cpm$  的平均值 ( $N$ );
3. 求出  $O$  管  $cpm$  的平均值 ( $B_0$ ), 减去  $N(B_0 - N)$ ;
4. 求出标准曲线及样品各管  $cpm$  的平均值, 减去  $N(B - N)$ ;
6. 按公式  $\frac{B - N}{B_0 - N} \times 100$ , 或  $\frac{B - N}{T} \times 100$ , 求出标准曲线各管和样品管结合的 %;
7. 在半对数纸上以标准曲线各点结合的百分数对激素浓度作出标准曲线如图 2、图 3 所示;

8. 按样品稀释度和回收率计算各样品激素含量

### 主要参考文献

- [1] Exley, D., M. W. Johnson and P. D. G. Dean. 1971. Antisera highly specific for  $17\beta$ -oestradiol. *Steroids* 18: 605-620.
- [2] 东方科学仪器进出口公司 1980。优质雌激素抗血清, 最终稀释度可达 1:350,000。
- [3] 中国科学院动物研究所 1980。一种优质孕酮抗血清(兔)可供放射免疫测定之用。 *动物学报* Vol. 26(4): (封四右栏)