

密切的关系。

3. 在小剂量慢性照射下, 生精细胞数量按它们在精子发生过程中的发育顺序依次减少。精原干细胞具有耐辐射的特性。支持细胞和间质细胞对辐射具有高度的耐辐射性。

4. 本实验条件下, 辐射引起生精细胞枯竭的主要原因初步认为是, 射线损伤了增殖和分化的A型精原细胞: 中间型以后的各发育阶段细胞仍按正常的速度继续分化, 发育。因在精子发生过程的早期连续的生精过程受到阻断, 而造成生精细胞的逐渐枯竭, 最后导致精小管和睾丸组织的严重萎缩。

参 考 文 献

- [1] Lorenz, E. et al.: *Radiology*, 49, 274, 1947.
- [2] 施履吉: 《定量组织学实验技术》p. 139, 1964.
- [3] Clermont, Y. et al.: *Amer. J. Anat.*, 93, 475, 1953.
- [4] Eschenbrenner A. B et al.: *J. Nat. Cancer Inst.*, 9 133, 1948.
- [5] Kohn, et al.: *Brit. J. Radiology*, 17, 586, 1954
- [6] Nebel, B. R.: *Cytologia*, 28, 81, 1963.
- [7] Clermont, Y. et al.: *Amer. J. Anat.*, 122 237, 1968.
- [8] Huckins, C.: *Anat. Rec.*, 169, 533, 1971.
- [9] Huckins, C.: *Cell Tissue Kinet.*, 4, 139, 1971.
- [10] Dym, M. et al.: *Amer. J. Anat.*, 128, 265, 1970.
- [11] Clermont, Y.: *Physiol. Rev.*, 5, 198, 1972.

[本文于1979年2月5日收到]

竞争性蛋白质结合分析法测定血清 甲状腺素的两种方法

王仁芝 宋兰芝 胡纽秋
严敏官 侯桂珍 姚敏仁

(中国科学院生物物理研究所)

本文介绍两种测定血清甲状腺素的竞争蛋白质结合分析法:

(一) 葡聚糖凝胶 G-25 (Sephadex G-25) 微柱法(以下简称“方法 I”)。

(二) 碱-热变性内源甲状腺素结合球蛋白法: 采用 0.2N 的 NaOH, 60℃ 温育 30 分钟变性内源 TBG 的方法(以下简称“方法 II”)。

应用两种方法, 测定了一定数量的正常人血清甲状腺素(T_4)值范围, 以及部分甲状腺功能亢进和功能低下患者的 T_4 值。

按本法用放射性同位素做体外测定, 所受干扰因素少, 方法灵敏准确, 优越于吸碘试验和蛋白结合碘等的测试方法。另外, 方法简便, 易于掌握, 不用免疫动物, 不需大型设备, 利于推广普及, 适用于临床。同时它也是检查动物甲状

腺功能的可靠手段, 适用于生物学和医学实验研究。

材 料 与 方 法

一、试剂

1. ^{125}I -甲状腺素: (^{125}I - T_4) 由中国科学院原子能研究所供应。放射比度为 40—50 微居/微克 T_4 。用 80mM NaOH (方法 I) 及 20% 1,2-丙二醇稀释(方法 II) 250—1,000 倍。

2. 巴比妥缓冲液: 75mM, pH 8.6。

3. 甲状腺素标准液 (T_4 标准液, 1 毫克/毫升): L- T_4 (匈牙利产品) 25.0 毫克溶于 1.5 毫升 80mM NaOH 溶液中, 用 20% 丙二醇稀释至 25.0 毫升。分装、冰冻保存。可用半年。

使用前, 用巴比妥缓冲液稀释为: 0、2.0 (或

2.5)、5.0、10.0、15.0、20.0 及 30.0 微克/分升的 T_4 标准工作液。

4. 甲状腺素结合球蛋白试剂 (TBG): 晚期孕妇血浆, 分装冰冻保存。用前, 以巴比妥缓冲液稀释, 常用浓度为 1.0%。

5. 葡聚糖凝胶 G-25 (Sephadex G-25): 瑞典产品, 为 20—80 微米。国产凝胶 (上海长征制药厂出品), 粒度为 100—200 目。

6. 717 型阴离子交换树脂: 由中国科学院原子能研究所供应。

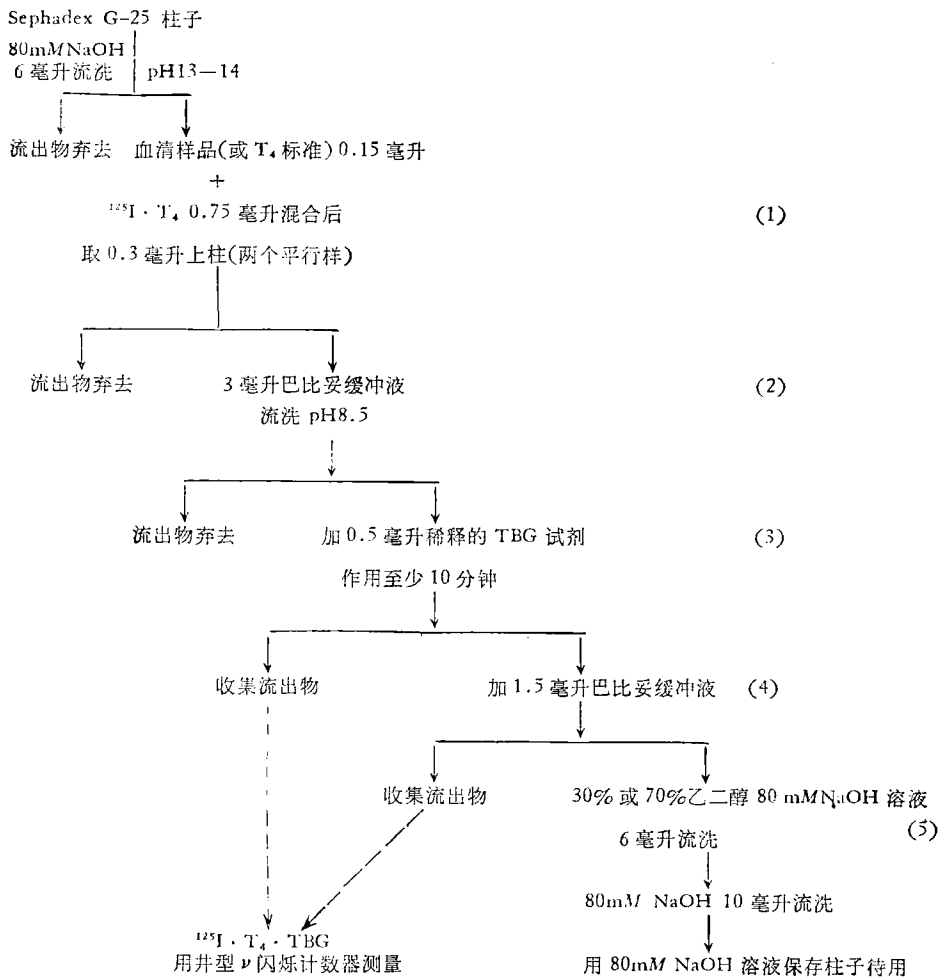
7. 酸、碱溶液: 方法 I 用 80mM NaOH。方法 II 用 0.2N NaOH, 0.2N HCl。

二、葡聚糖凝胶 G-25 微柱的制备

微柱如图 1 及照片所示, 玻璃管 9×100 毫米, 下端不锈钢管直径为 1 毫米。准确称 0.3 克 Sephadex G-25, 浸胀后全部装入每个柱内, 将直径 9 毫米的原滤纸片紧贴于凝胶表面上。钢管下端用塑料帽塞住。柱子通常在室温用 80 mM NaOH 溶液保存。每使用一段时间后, 要搅动凝胶, 以免聚结, 并排出气泡, 同时更换滤纸 (防止凝胶丢失)。

三、试验步骤

1. 葡聚糖凝胶微柱法:



说明:

(1) 血清中的 T_4 在 pH13—14 条件下, 与内源 TBG 分离, T_4 和 $^{125}\text{I}-T_4$ 被吸附于柱内。

(2) 内源 TBG 与其他血清蛋白质被流洗

出柱。

(3) $^{125}\text{I}-T_4$ 和 T_4 与 TBG 试剂竞争结合, 形成 $^{125}\text{I}-T_4 \cdot \text{TBG}$ 和 $T_4 \cdot \text{TBG}$ 。

(4) 待测的 $^{125}\text{I}-T_4 \cdot \text{TBG}$ 与 $T_4 \cdot \text{TBG}$ 流

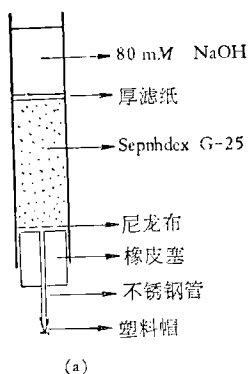


图 1a 微柱示意图

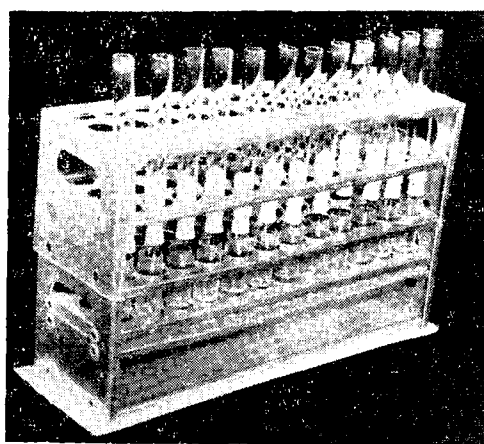


图 1b 微柱实物图

洗出柱。游离的 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和 T_4 仍留在柱内。

(5) 把游离的 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 和 T_4 自柱内用乙醇洗脱,使柱子再生待再次使用。

2. 碱-热变性内源 TBG 法:

血清样品(或标准 T_4) 0.1 毫升
 +
 0.2N NaOH 0.5 毫升
 ↓ 温育 60°C 30 分钟
 +
 0.2N HCl 约 0.5 毫升(注 1)
 ↓ 混合 5 分钟
 +
 $^{125}\text{I}-\text{T}_4$ 0.1 毫升
 +
 1.0% TBG 0.5 毫升
 ↓ 混匀 $4^\circ\text{C}-8^\circ\text{C}$ 30 分钟
 +
 717 型阴离子交换树脂 300 毫克

或

吸去上清液,测瓶底树脂 (测游离部分, F) 吸取上清液 0.1 毫升置测量瓶中(测结合部分, B)

[注 1] 使 pH 为 8.6 的准确用量。

四、放射性测量及计算

用井型 γ 闪烁计数器,测量 100 秒的 cpm。

(1) T_4 结合率计算:

$$\text{每管结合率} \left(\frac{B}{B_0} \% \right) = \frac{\text{样品(或标准)cpm}}{\text{"O" 标准 cpm}} \times 100 \%$$

$$\text{每管结合比} \left(\frac{B_0}{B} \right) = \frac{\text{"O" 标准 cpm}}{\text{样品(或标准)cpm}}$$

(2) T_4 游离率计算:

$$\text{每管游离率} \left(\frac{F}{T} \% \right) = \frac{\text{样品(或标准)cpm}}{\text{全计数 cpm}} \times 100 \%$$

实 验 结 果

一、标准抑制曲线 以 T_4 标准浓度 (微克/分

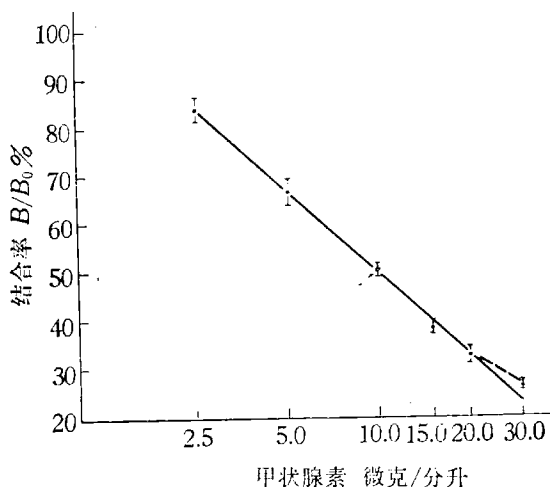


图 2 甲状腺素标准抑制曲线(方法 I)

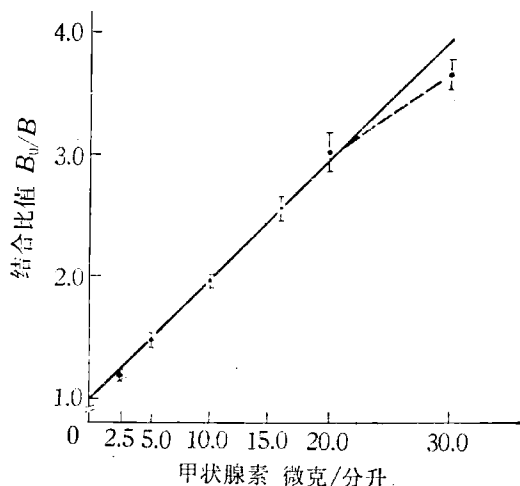


图 3 甲状腺素标准抑制曲线(方法 I)
(瑞典 Sephadex G-25)

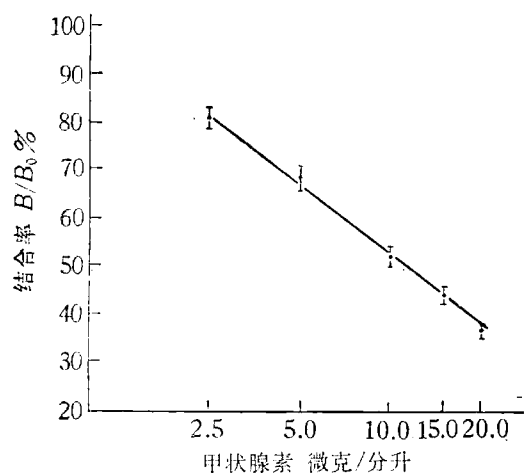


图4 甲状腺素标准抑制曲线(方法 I)
(国产 Sephadex G-25)

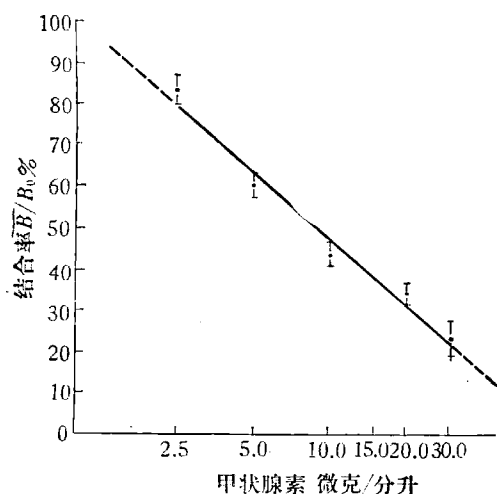


图5 甲状腺素标准抑制曲线(方法 II)
(6 次结果)

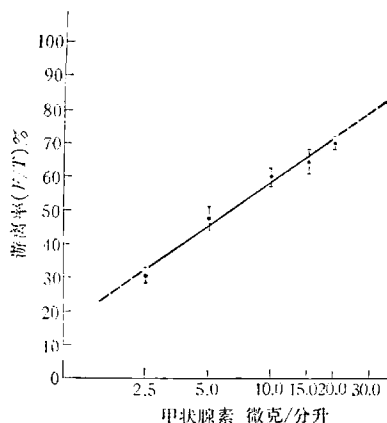


图6 甲状腺素标准抑制曲线(方法 II)
(5 次结果)

升) 与其相对应的结合率 $\left(\frac{B}{B_0}\right)\%$ 、结合比

$\left(\frac{B_0}{B}\right)$ 或游离率 $\left(\frac{F}{T}\right)\%$ 作图, 得到 T_4 标准抑制

曲线。图 2、3、4 为方法 I 的标准曲线, 图 5、6 为方法 II 的标准曲线。

二、人血清中甲状腺素浓度: 用两种方法检查各种甲状腺机能状态人的血清, 得到血清中 T_4 的浓度, 列于表 1 中。

表 1 不同甲状腺机能状态人的血清 T_4 值

方 法		组 别	例数	平均值 (微克/ 分升)	SD (微克/ 分升)	实例范围 (微克/分升)
微柱法	瑞典凝胶	正常成人	71	10.2	1.9	5.7—13.9
		甲状腺机能亢进	15	23.2	5.2	16.8—33.0
		甲状腺机能低下	8	2.7	0.76	1.5—3.8
	国产凝胶	正常成人	46	10.3	2.4	4.7—14.5
		甲状腺机能亢进	4	22.0	—	18.5—26.5
		甲状腺机能低下	3	2.8	—	0.65—4.0
碱热变性法	正常成人	101	8.48	1.96	4.0—13.8	
	甲状腺机能亢进	22	19.99	4.71	14.0—34.0	
	甲状腺机能低下	8	3.54	0.53	2.3—3.9	

两种凝胶柱所得人血清甲状腺素正常值是一致的 ($t = 0.2529$, $df = 115$, $p \gg 0.5$), 没有差别。

参考相近方法 (表 2), 确定了这两种方法测定正常人血清 T_4 值范围。

表 2 相近方法正常人血清 T_4 值比较

方 法 (简称)	检测人数	正常人 T_4 值范围 (微克/分升)	参考文献
碱 法	43	4.0—11.0	(3)
热变性法	57	4.0—12.0	(4)
胃蛋白酶法	50	5.0—13.0	(5)
碱-热变性法	101	4.0—12.0	(方法 II)
微柱法		4.5—12.0	(7)
微柱法	71	5.5—15.0	(方法 I)

三、回收率 为检验方法的准确性, 向混合血清中加入定量未标记 T_4 , 测其回收率。表 3, 为方法 II 的回收试验。

表 3 T_4 回收率(碱-热变性法)平均回收率 104.4%

血清浓度	T_4 量(微克/分升)		回收率(%)
	加入 T_4	测量 T_4	
正常混合血清	—	11.0	—
50%正常混合血清	—	5.5	—
50%正常混合血清	2.5	8.6	107.5
50%正常混合血清	5.0	9.8	93.3
25%正常混合血清	—	2.4	—
25%正常混合血清	2.5	5.2	106.1
25%正常混合血清	5.0	8.2	110.8

两方法的平均回收率分别为 95%—98.3% (方法 I 瑞典凝胶)、98.98% (方法 I, 国产凝胶)和 104.4% (方法 II)。

四、重复性 为检验方法在重复使用过程中的可靠性、重复性,将正常人血清样品,在数日至数月内进行多次重复试验。结果见表 4。

表 4 方法的重复性

方 法		例 数	重复次数	变异系数均值
微柱法	瑞典产	11	51	±9.8%
	国 产	16	81	±5.8%
碱-热变性法		2	18	±9.54%

五、最低检出量 检验方法的灵敏度,将最低的 T_4 量加入到巴比妥缓冲液中,测得可分辨的、有统计学意义的最低 T_4 检出量,方法 I、II 皆为 0.5 微克/分升。

六、相关检验 两方法与解放军总医院改良 Murphy 方法测得的正常人 T_4 值(共用相同血清样品)进行相关检验,方法之间有明显的相关性。结果见表 5 及图 7、8。

表 5 与解放军总医院方法相关比较

方 法	回归方程	相关系数
微 柱 法	$X_1 = 0.942X_2 - 1.4$	$r = 0.87$ ($n = 63, P < 0.001$)
碱-热变性法	$X_1 = 1.090X_3 - 0.15$	$r = 0.87$ ($n = 90, P < 0.001$)

注 X_1 ——解放军总医院 T_4 值。
 X_2 ——微柱法 T_4 值。
 X_3 ——碱-热变性法。

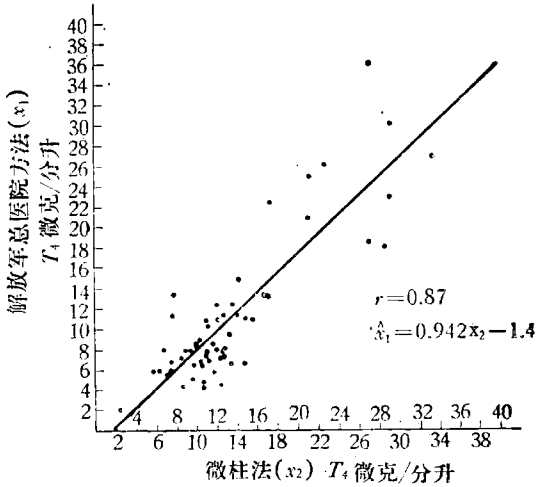


图 7 两种方法的相关比较

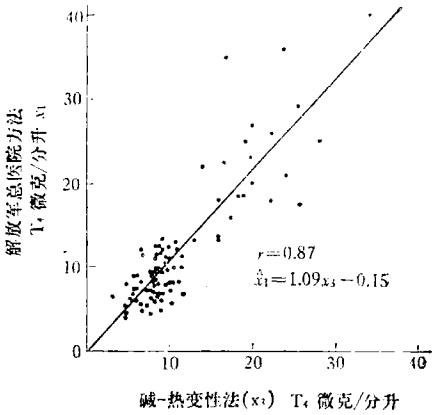


图 8 两种方法的相关比较

讨 论

一、微柱法中关于柱子性能的讨论

1. 微柱法的特点 Sephadex G-25 能与 T_4 结合,同时又起到分子筛的作用。在 pH13—14 的环境中, Sephadex G-25 能与 $^{125}\text{I}-T_4$ 及从内源 TBG 分离出来的 T_4 结合,而内源 TBG 和其他可能产生干扰的蛋白质,因分子量大而被洗脱掉。在 pH8.5 的环境中,加入的 TBG 试剂,又与凝胶柱上的 T_4 及 $^{125}\text{I}-T_4$ 发生竞争结合反应,形成 $^{125}\text{I}-T_4 \cdot \text{TBG}$ 与 $T_4 \cdot \text{TBG}$ (TBG 试剂结合 T_4 的能力比 Sephadex G-25 大)。 $^{125}\text{I}-T_4 \cdot \text{TBG}$ 因分子量大被洗脱后测定放射性。Sephadex G-25 又起到分离 $^{125}\text{I}-T_4$ 与 $^{125}\text{I}-T_4 \cdot \text{TBG}$ 的作用。因此,在 Sephadex G-25 微柱上既能完成变性

内源 TBG, 抽提 T_4 的工作; 又能完成分离 $^{125}\text{I}-T_4$ 和 $^{125}\text{I}-T_4 \cdot \text{TBG}$ 的步骤。

用国外的 Tetralute 测定 T_4 药箱 (也是一种微柱法) 和本方法测定同一组血清样品相比较, 本方法较省时间, 且柱子可反复使用。

2. Sephadex G-25 微柱间的平行度 柱内的反应与试管内的均相反应有所不同, 它受柱子本身状况, 如凝胶的装柱量、丢失、柱子的均一性和柱子再生等情况的影响。因此, 必须注意试验中柱间的差异性, 即平行样品的平行度。结果见表 6, 表明柱子虽经反复使用和再生, 平行程度仍较好, 而且两种凝胶柱也很一致。

表 6 柱子的平行度

微柱种类	柱 数	平行样品数 (对)	平均平行相差值
瑞典产凝胶柱	64	32	2.2%±1.7%
国产凝胶柱	70	35	2.1%±1.8%

表 7 再生后柱子的残存放射性

再生次数	残存放射性% (9 柱平均值)
1	2.3
2	3.8
3	4.9
4	3.5

3. 微柱的再生性 用含 30% 乙二醇的 80 mM NaOH 溶液代替血浆再生柱子, 每次再生后测柱内残存放射性。由表 7 可见, 残存放射性并不因使用次数的增加而加多。

二、国产与瑞典产 Sephadex G-25 性能比较

为采用国产凝胶, 以便推广使用, 较详细地从标准抑制曲线、血清 T_4 正常值、样品回收率、样品重复性 (变异系数) 以及柱间的平行度等五个方面对国产与瑞典产 Sephadex G-25 凝胶柱进行了比较, 结果说明, 国产的 Sephadex G-25 的性能不次于瑞典产品, 能满足测定 T_4 之用。

三、 T_4 标准液的稀释剂

据国外的 T_4 药箱及 T_4 测定的文献记载, 多采用清蛋白稀释 T_4 标准液或提供含 T_4 的冰冻干燥标准血清。考虑到清蛋白价格较贵, 大量供应含 T_4 冰冻干燥标准血清也较困难, 不能满足

大量测定之用, 我们将含蛋白与不含蛋白的标准抑制曲线对应点数值进行比较 (见表 8 和图 9), 可以看出含蛋白与否对标准抑制曲线的影响不大。为便于推广应用, 完全可以用巴比妥缓冲液稀释标准物, 并不影响结果的测定。

表 8 巴比妥缓冲液与人血清清蛋白稀释标准 T_4 的比较

T_4 微克/分升	巴比妥缓冲液稀释标准 0.5% 清蛋白稀释标准的比值 (5 次均值)	巴比妥缓冲液稀释标准 5% 清蛋白稀释标准的比值 (4 次均值)
2.5	0.995	1.012
5.0	1.010	1.019
10.0	1.018	1.007
15.0	0.971	0.990
20.0	0.961	1.004

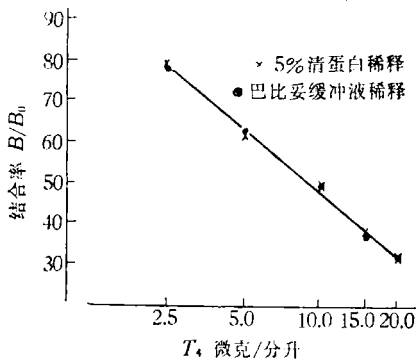


图 9 两种稀释的标准曲线

四、TBG 适宜浓度的选择

本方法所使用的 TBG 试剂为晚期孕妇血浆, 需要稀释。各批来源的混合晚孕血浆其结合效价不同。因此, 选择每批 TBG 的适当浓度很重要。一方面要根据饱和曲线, 取其结合率为 50—60% 的 TBG 浓度, 另一方面要考虑不同浓度 TBG 对标准抑制曲线的影响。如图 10 所示, 当 TBG 稀释倍数较小时, 标准曲线的斜率小, 从而降低了方法的灵敏度; 当加大 TBG 稀释度, 灵敏度变高, 但使用范围变窄。因此, 需要结合以上两方面情况, 选择较适当的 TBG 浓度。

五、待测 T_4 从内源 TBG 分离条件的选择

方法 II 选择最佳条件使内源 TBG 充分变性, 释放出 T_4 , 此步骤很重要。从表 9 可见, 同

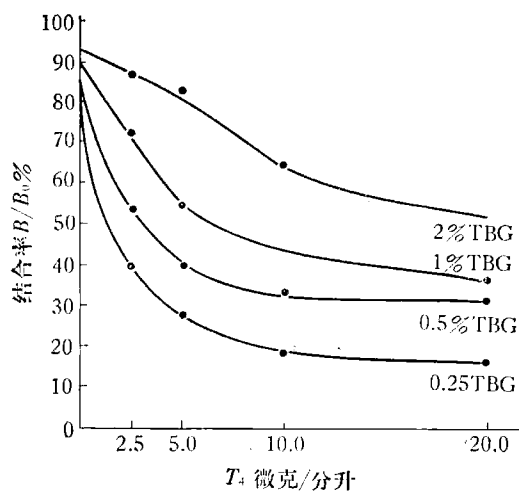


图 10 TBG 浓度对标准曲线的影响
(方法 II)

一血清样品在不同条件下的分解率 (即使待测血清中内源 TBG 变性, 以释放 T_4 的百分率) 不同。

(1) 单一的热变性条件, 其分解率不高, 为

表 9 不同条件的分解率

序 号	分 解 条 件			分解率
	(1)NaOH	(2)温浴	(3)HCl(注)	
1	0.1N	—	—	75.40
2	0.1N	—	0.1N	45.86
3	0.1N	—	0.2N	68.46
4	0.1N	—	0.5N	72.85
5	0.1N	—	1.0N	67.29
6	0.1N	60°C 30 分	0.1N	75.80
7	0.1N	60°C 30 分	0.2N	81.27
8	0.1N	60°C 30 分	0.5N	83.80
9	0.1N	60°C 30 分	1.0N	74.93
10	0.2N	—	—	97.12
11	0.2N	—	0.2N	59.69
12	0.2N	—	0.5N	63.79
13	0.2N	—	1.0N	70.30
14	0.2N	60°C 30 分	—	97.60
15	0.2N	60°C 60 分	—	97.40
16	0.2N	60°C 30 分	0.2N	93.67
17	0.2N	60°C 30 分	0.5N	91.56
18	0.2N	60°C 30 分	1.0N	88.87
19	—	60°C 30 分	—	74.50
20	—	60°C 60 分	—	70.20

注 1. 各条件按所标 (1) (2) (3) 顺序加入。

2. NaOH 为 0.5 毫升, HCl 为中和 NaOH 使 pH 达 8.6 的量。

74.50%。

(2) 单一的碱变性条件下, 当用 HCl 中和 NaOH 以后, 分解率只有 59.69%。有可能加 NaOH 后, 内源 TBG 变性仍不完全; 亦可能是加 HCl 中和以后, 部分内源 TBG 恢复活性, 又重新与 T_4 结合。

(3) 用 0.2N NaOH 与热变性相结合的条件, 分解率明显提高, 而且再用 0.2N HCl 中和至 pH8.6 以后, 仍保持较高的分解率 (为 93.67%)。说明此条件下能较彻底地变性内源 TBG 使 T_4 游离出来, 同时也能保护外源 TBG。

六、717 型阴离子交换树脂的分离效果

竞争结合反应后, 在 T_4 结合型与游离型的动态平衡体系中, 将两部分有效地分离开, 测其中一部分是很关键的一步。“碱-热变性法”采用 717 型阴离子交换树脂, 证明树脂对游离 T_4 吸附力很强, 每管约 300 毫克, 吸附率可达 98% 左右。但从表 10 可见, 用同一血清试验, 随接触时间的加长, 树脂对游离 T_4 的吸附率增加并趋于最高值, 而样品的结合率则相应下降。这表明树脂破坏了原平衡体系, 又将已结合的 T_4 重新吸附下来。减少了结合型 T_4 , 影响样品检出的 T_4 浓度。

表 10 树脂接触时间的比较

接触时间(分)	树脂吸附率(%)	样品结合率(%)
1	87.90	72.61
2	94.32	—
3	98.74	71.16
4	99.24	66.69
5	98.81	60.29
10	—	42.81
15	—	33.54

故方法 II 选择树脂接触时间以 3—5 分钟较适宜, 因其吸附率最高, 对样品结合率的影响不大。为此, 要求迅速而准确地吸取上清液置测量管中, 控制与树脂的接触时间。

为克服树脂因接触时间的差异所造成的不准确, 我们改用测量树脂的 T_4 游离部分。采用

图 11 的吸滤装置。加树脂振荡 3—5 分钟后，用吸滤装置能迅速地吸去全部上清液，测量留在原塑料瓶中的树脂，可得到 T_4 的游离率。从图 6 的 T_4 标准曲线可见，曲线的斜率良好。用同一正常血样分别 8 次重复试验，其平均值为 8.26 ± 1.10 微克/分升，重复性良好。

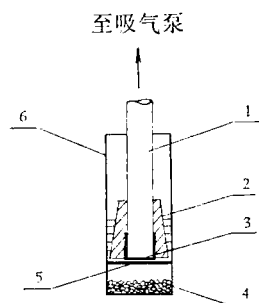


图 11 吸滤装置

1. 玻璃管, 2. 橡皮塞, 3. 尼龙布,
4. 树脂, 5. 滤纸, 6. 塑料管

小 结

本文介绍两种测定血清甲状腺素的方法。方法灵敏、准确性和重复性良好。与国内同类

方法相比较，所测得的人血清甲状腺素值有明显的相关性，与国外文献报道的正常值范围也相符合。试验操作简单，不需大型设备，便于推广和普及。

两种方法测定过兔抗 T_4 血清的效价，因此又可用于 T_4 放射免疫测定。

本工作得到中国科学院原子能研究所、解放军总医院、首都医院、北京东四产院、工农兵医院、朝阳医院的协助，特此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Ekins, R. P.: *Clin. Chim. Acta.*, 5, 453, 1960.
- [2] Murphy, B. E. P. et al.: *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 24, 187, 1964.
- [3] Wong, W. H.: *Clin. Chemistry*, 21, 216, 1975.
- [4] Mitchell, M. L.: *J. Nuclear Med.*, 14, 336, 1973.
- [5] 中国科学院原子能研究所、解放军总医院：竞争性蛋白结合分析法测定血清甲状腺素。
- [6] Kue Hung Chau, et al.: *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 42, 189, 1976.
- [7] Alexander, N. M.: *Clin. Chemistry*, 20, 553, 1974.

[本文于 1978 年 9 月 1 日收到]

固定化链霉菌生产异构糖试验

中国科学院上海生物化学研究所固相酶组

上海市工业微生物研究所异构酶组

上海汽水厂异构糖试验组

异构糖是一种新型甜味剂，它是由葡萄糖部分地异构化成果糖而制得的。当果糖的含量为 42%、葡萄糖的含量为 58% 时，异构糖的甜度与同样浓度的蔗糖相仿。六十年代末以来，它受到人们广泛的注意。在世界糖价急剧上涨的七十年代初期，异构糖生产的应用研究更获得了显著进展。

葡萄糖的异构化有碱催化法及生物法两种。碱催化法是将葡萄糖溶液加碱到 pH12 以上，使葡萄糖发生异构反应而成果糖。这种方

法，由于异构化过程中副反应多，转化率低，而且影响产品颜色和口味，造成产品精制困难，因而工业上很少采用。生物法则是靠葡萄糖异构酶来催化葡萄糖向果糖转化的，在这过程中，没有副反应发生，因此工业上已采用此工艺，产量逐年增加。葡萄糖异构酶存在于多种微生物中，为细胞内酶。自 1966 年以来工业上生产异构糖都是用发酵液或菌体来进行的，但是产品的后处理上还存在很大困难。

六十年代后期固定化酶(即固相酶)迅速发