

表3 方法学精密度实验

	<i>n</i>	$\bar{x}/U$	<i>s</i>	<i>CV</i> /%
批内变异	8	1.9958	0.0452	2.26
批间变异	3	2.0133	0.0624	3.10

2.7 两种测定方法的比较

目前国内用 DTNB 直接法测定全血中 GSH-PX 活力的方法有夏奕明, 张嘉麟等提出

表4 同一样品两种测定方法吸光度值比较

($\bar{x} \pm s$)

反应管	夏氏法 (<i>A</i>)	本法 (<i>A</i>)
离心上清液 (280nm)	0.161 ± 0.003	0.008 ± 0.0002
非酶反应管 (423nm)	0.371 ± 0.02	0.366 ± 0.01
样品测定管 (423nm)	0.424 ± 0.02	0.314 ± 0.007
试剂空白管 (423nm)	0.230 ± 0.01	0.039 ± 0.004

的改良法. 我们采用夏氏法作对照对同一血样进行测定, 操作按表1进行. 分别于280nm,

423nm 处比较各反应管的 *A* 值, 两种方法均重复测定5次. 由表4可知, 用本法离心后上清液280nm 处 *A* 值远低于夏氏法, 显然用 TCA 作沉淀剂作用比较完全. 本法样品测定管423nm 处 *A* 值略低于夏氏法, 但计算时需将样品测定管 *A* 值减去试剂空白管 *A* 值. 其差值以本法为高. 很明显, 本法的灵敏度优于夏氏法.

参 考 文 献

- 1 Mills G C. J Biol Chem, 1959; **234**: 502
- 2 Rotruck J T. Science, 1973; **179**: 588
- 3 Lawrence R A. Biochem Biophys Res Commun, 1976; **71**: 952
- 4 Hafeman D G, Sunde R A, Horfadyts W G. J Nutr, 1974; **104**: 580
- 5 夏奕明, 郭莲珍. 卫生研究, 1987; **16** (4): 29
- 6 张嘉麟, 方允中. 中华医学检验杂志, 1985; **8**: 199
- 7 Paglia D E, Valentine W N. J Lab Clin Med, 1967; **70**: 158

促甲状腺激素抗血清的研制

周 棱

(中国原子能科学研究院, 北京 102413)

摘要 用较少的抗原量免疫绵羊, 采用活体采血法, 定期加强免疫, 定期补铁, 定期采血, 获得抗人促甲状腺激素 (TSH) 抗血清. 采用放免分析方法鉴定抗血清, 结果为: 抗血清滴度为28—205万, 与促卵泡激素、促绒毛膜生长激素、促黄体生成素交叉都小于0.02%, 亲和常数 *K* 大于 10^{10} L/mol.

关键词 促甲状腺激素 (TSH), 抗血清, 放射免疫分析

1 实验方法

TSH (促甲状腺激素) 澳大利亚进口. 福氏佐剂 (中国原子能科学研究院), 右旋糖苷铁注射液 (上海第一制药厂).

1.1 免疫原的制备

取200μl TSH (1μg/μl) 加入去活卡介苗200μl (75mg/ml) 及适量生理盐水, 与等量福

氏佐剂混合乳化, 制成免疫原.

1.2 免疫过程

选年轻健壮绵羊两只, 背部皮内多点注射免疫原2ml, 同时注射双百疫苗0.5ml. 半月后加强, 剂量减半. 以后每月加强一次, 加强后10d颈动脉采血测滴度. 3个半月后滴度达

到25万。

1.3 采血

至滴度合适后, 采用活体采血法, 即在不杀死动物的前提下, 每两星期放血一次, 放血后补充铁剂; 每只5ml (50mg/ml)。血清分装, -50℃保存。

2 抗血清的鉴定

2.1 滴度的测定 采用放射免疫分析方法测定 $B/T=50\%$ 时的抗血清稀释度, 该稀释度为抗血清的滴度。

1号抗血清: 44—205万

2号抗血清: 28—90万

2.2 特异性实验 分别用促卵泡激素(FSH), 促黄体生长素(LH), 促绒毛膜生长激素(HCG)作为类似物进行交叉反应实验。以 $B/T=50\%$ 时 TSH 与类似物浓度的百分比作为抗血清与类似物之间的交叉反应率(表1)。

表1 TSH 抗血清与类似物的交叉率 (%)

	FSH	LH	HCG
1号抗血清	<0.02	<0.02	<0.00006
2号抗血清	<0.02	<0.02	<0.00006

2.3 亲和常数的测定 按放免分析试剂盒中方法作出抑制曲线。用 Scatchard 作图法回归计算, 求出抗血清的亲和常数。

1号抗血清: $K=2.4 \times 10^{10} \text{L/mol}$

2号抗血清: $K=1.07 \times 10^{10} \text{L/mol}$

3 讨论

制备出适合放射免疫分析(RIA)的抗人糖蛋白激素的抗血清较为困难^[1,2]。其中最重要的原因是特异性不高, 与所有的糖蛋白激素均有交叉。这是因为 TSH 与其它糖蛋白激素 FSH, LH, HCG 等一样, 由两个非共价结合的亚单位 α , β 组成, 而这四种激素的 α 亚单位结构非常相似, 且具有相同的免疫活性, 只有 β 亚单位不同并具各自的生物特性。所以在 TSH- α 放免分析中, 与其它激素的交叉反应很

大, 实验结果很不可靠。而在 TSH- β 放免分析中, 交叉反应都小于 1% ^[3-6]。如果共有 α 亚单位是交叉反应之所以较大的唯一原因, 明显的解决办法就是用 β 亚单位作免疫原, 但 β 亚单位的免疫原性比全 TSH 弱, 所得抗血清滴度不高且亲和性差^[7]。但总的来说国内外此工作中用 β -TSH 作免疫原的较多。作者出于价格方面原因以全 TSH 作免疫原同样得到较好结果, 与 Thorell 等报导的实验结果相符。Thorell 等报导了用全 TSH 作免疫原得到高滴度的抗血清, 其交叉率与以 β 亚单位作免疫原时相同, 这与作者实验结果相符。表2给出

表2 TSH 及 LH 亚单位氨基酸含量比较 (%)

氨基酸残基	TSH- α	TSH- β	LH- α	LH- β
赖氨酸	10.2	8.26	8.98	1.64
组氨酸	2.87	2.48	2.65	2.38
精氨酸	3.15	4.13	2.76	6.23
天冬氨酸	5.37	7.34	5.20	3.61
苏氨酸	7.96	8.62	7.76	5.23
丝氨酸	5.19	4.32	5.10	5.66
谷氨酸	7.22	5.78	7.04	4.75
脯氨酸	5.65	5.41	6.30	15.5
甘氨酸	3.43	3.58	3.57	5.49
丙氨酸	6.11	4.95	6.02	6.23
半胱氨酸	7.50	8.44	8.67	10.7
缬氨酸	4.07	4.22	4.18	5.66
蛋氨酸	3.52	3.39	3.45	2.30
异亮氨酸	1.85	4.86	1.84	3.11
亮氨酸	1.85	3.67	2.04	9.10
酪氨酸	4.72	8.53	4.08	1.56
苯丙氨酸	4.35	3.76	3.57	2.30
岩藻糖	0.003	0.008	0.004	0.006
甘露糖	5.37	2.23	6.90	2.05
蔗糖	0.002	0	0.001	0.008
氨基葡萄糖	5.93	2.84	5.41	2.95
半乳糖胺	2.31	1.38	1.03	1.15
残基总数	108	109	98	122

TSH- α , TSH- β 及 LH- α , β 亚单位中的氨基酸含量百分比, 以作比较^[8].

抗血清的质量直接影响到 RIA 方法的灵敏度和准确性, 但影响抗血清质量的因素很多, 主要有: a. 免疫动物的选择 (包括年龄、体重、健康情况等), 因为一个化合物的免疫原性和被免疫动物的异己性有十分密切的关系, 异己性越大, 免疫原性越强. b. 免疫原的纯度及免疫原性的强弱, 纯度越大, 抗血清与类似物的交叉就越小, 免疫原性越强, 获得高滴度的抗血清的时间越短. c. 免疫原的剂量, 通常假设合成高亲和力的细胞具有高亲和力受体, 在抗原浓度低的情况下能受到最佳刺激, 而产生低亲和力抗体的细胞要在抗原浓度高的条件下才能受到最佳刺激, 这样, 使用低剂量的抗原有利于高亲和力抗体的产生^[9]. 最近的研究也倾向于以小剂量持续免疫动物. d. 动物个体之间的差异, 在免疫足够量的动物时, 有可能或得一个或几个特异性好、滴度高的抗血清. e. 免疫时间的长短, 免疫后抗体迅速增加, 一般 3—8 个月可得到较好的抗血清, 免疫时间长, 抗体亲和性随之增高, 但交叉也随之增大.

目前免疫一抗所用动物主要有家兔、豚鼠、绵羊. 过去我室也曾几次用 TSH 免疫家兔, 所得抗血清滴度不高, 交叉也比较大, 效果均不理想. 另经典免疫常常需毫克级的抗原, 这对原料较贵的 TSH 等来说是不可能的. 因 TSH 免放药盒抗血清使用量较大, 免疫家兔或豚鼠都不能满足需要 (每只兔子可出血清量: 50—60ml, 每只豚鼠可出血清量: 10—15ml). 作者此次用与免疫家兔相差不大的抗原量 (免疫家兔 30—40 μ g 每只、免疫绵羊 50 μ g 每只) 免

疫绵羊, 得到了大量抗血清, 这与 Lynch 等人报导的用 100 μ g FSH 免疫家兔^[10]得到的实验结果相符.

此次免疫 TSH 抗血清, 作者首次在免疫一抗中采用活体采血法. 即在不杀死动物的前提下, 每次从颈动脉采血 200—300ml, 接着加强免疫, 然后再取血. 如此循环, 这样为以后免疫一些原料较贵而所需量较大的抗血清做了有益的尝试. 同时为保证血清质量, 我们采用了给动物补铁的方法. 即在每次采血后, 给绵羊注射抗贫血药——右旋糖酐铁 5 ml (50mg/ml). 此药为右旋糖酐与铁的络合物的灭菌胶体溶液, 主要用于缺铁性贫血.

致谢 本工作得到我室燕强奋和赵铁占同志的帮助, 在此表示感谢.

参 考 文 献

- 1 Thorell J I, Holmstrom B. *J Endocrinology*, 1976; **70**: 335
- 2 Odell W D, Abraham G, Raud H R *et al.* *Acta Endocrinology*, 1969; **63** (142): 54
- 3 Vaitukaitis J L, Ross G T, Reichert L E *et al.* *Endocrinology*, 1972; **91**: 1337
- 4 Pierce J G. *Endocrinology*, 1971; **89**: 1331
- 5 Cornell J S, Pierce J G. *J Biol Chem*, 1973; **248**: 4327
- 6 Kourides A, Weintraub B D, Levko M A *et al.* *Endocrinology*, 1974; **94** (5): 1411
- 7 Thorell J I, Holmstrom B. *J Endocrinology*, 1976; **70**: 335
- 8 Ta-Hsiu Liao, Hennen G, Howard S M *et al.* *J Biol Chem*, 1970; **245** (13): 3275
- 9 李振甲, 王仁芝主编. 激素的放射免疫分析. 北京: 科学技术文献出版社, 1985: 36
- 10 Lynch S S, Shirley A. *J Endocrinology*, 1975; **65**: 127

Zhengxing, Liu Huizhong, Bao Jingqi, Chen Hongzhan, Sun Yuyan, Sun Chen. (*Department of Pharmacology, Shanghai 2nd Medical University, Shanghai 200025*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (4): 362—366

A direct micro determination of glutathione peroxidase (GSH-PX) activity with spectrophotometry was developed. Conditions of the assay were studied in detail. 10 μ l blood sample was diluted with distilled water and treated with 10% TCA to remove protein. There was a good linearity between DTNB product and concentration of GSH after 3 minutes enzymatic reaction at the temperature of 37°C in pH 6.5 solution. The method had higher sensitivity, better reproducibility. It may become useful tool for analyzing GSH-PX in scientific research and clinical work.

Key words glutathione peroxidase (GSH-PX), spectrophotometry, assay

Production of Specific Antisera to Thyroid-stimulating Hormone (TSH). Zhou Ling. (*Department of Isotope, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (4): 366—368

Specific high titre antisera to TSH were raised in two sheeps injected with 100 μ g (booster injection, 50 μ g) highly purified TSH preparation by the multi-site intradermal immunization technique. Blood were bled at two week intervals by cardiac puncture without killing the animals and solution of anti-anemia drug was given to sheeps after each letting blood. The antisera were monitored by TSH RIA Kit. Titres were range from 28×10^4 to 205×10^4 and no cross-reaction occurred between TSH antisera and human LH, FSH, HCG and all antisera have the avidity more than 10^{10} L/mol.

Key words TSH, antiserum, RIA

Experimental Research on Naked DNA Gene Therapy of Parkinson's Disease. Cao Lei, Zheng Zhongcheng, Liu Xinyuan, Liu Zhen-guo, Zhao Yingchun, Chen Shengdi, Jiang Zhihua, Zhou Changfu. (*Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai 200031*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (4): 369, 289

In vivo naked DNA gene transfer method was used in gene therapy of Parkinson's disease (PD). The complex of rat tyrosine hydroxylase (TH) expression plasmid and Lipofectin was injected stereotactically into striatum of PD rat model. The asymmetric rotational behavior was reduced substantially and quickly. On the third day after injection, drug-induced rotation decreased 50% compared with pretreatment scores. Immunohistochemical staining showed TH-positive nerve cells in striatum of injection side, which indicated that TH gene was uptaken and expressed by nerve cells. These preliminary results have general implications for the application of naked DNA transfer technique in gene therapy of human neurological disease and specific implications for PD.

Key words Parkinson's disease, gene therapy, tyrosine hydroxylase

Production of TSH-Free Thyroid Stimulating Hormone Serum. Zhou Ling. (*Department of Isotope, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; 21 (4): 370—371

Using affinity chromatography to eliminate TSH from normal human serum. Preliminary treatment to TSH with 33% saturated ammonium sulfate were coupled to agarose in alkaline condition and packed in column (1.2cm $\times$