

母犬发情期生殖激素测定及其意义

张 凯

辽宁省阜新市现代农业发展服务中心, 辽宁阜新 123000

摘要 本试验从 15 只处于发情前期母犬中随机选取 6 只母犬, 检测其促黄体生成素(LH)、促卵泡素(FSH)和孕酮(P4)3 种激素, 实现对母犬发情期连续的监测过程。采用静脉采血, 抗凝低温离心后分别测定促黄体生成素(LH)、促卵泡素(FSH)、孕酮(P4)的含量, 促黄体生成素采用人促黄体生成激素放射免疫分析药盒的方法测定, 促卵泡素采用人促滤泡激素放射免疫分析药盒的方法测定, 孕酮采用孕酮放射免疫分析药盒的方法测定。测定结果显示: 母犬发情期的促黄体生成素的变化范围为 5.16~6.82 ng/mL (除峰值外), 其峰值平均值是 116.71 ng/mL; 母犬发情期的促卵泡素的变化范围为 3.18~4.78 ng/mL (除峰值外), 其峰值平均值是 43.56 ng/mL; 母犬发情期的孕酮的变化范围为 0.199 1~8.506 3 ng/mL, 其峰值平均值是 8.506 3 ng/mL。母犬在发情时, 可出现 LH 释放波, 并在 LH 开始释放后 24 h 内或开始发情的 1~2 d 内排卵。

关键词 母犬; 发情期; 促黄体生成素; 促卵泡素; 孕酮; 放免法测定

母犬在发情期的生殖激素水平会有一定规律的变化, 本试验通过对发情期母犬的连续监测, 采集静脉血, 分别采用人促黄体生成激素放射免疫分析药盒的方法、人促滤泡激素放射免疫分析药盒的方法和孕酮放射免疫分析药盒的方法对促黄体生成素(LH)、促卵泡素(FSH)和孕酮(P4)3 种激素进行检测, 从检查数据中总结、发现规律, 可以进一步来确定排卵时间, 从而能够更好地服务于犬的饲养和繁殖, 为犬人工受精和胚胎移植奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验时间与血样来源

本试验于 2017 年 9 月 10 日~12 月 30 日进行, 血样来自沈阳农业大学动物医院试验犬, 犬群 28 只, 对其中的 15 只发情母犬随机抽取 6 只采血。

1.2 试剂和诊断试剂盒

1) 肝素钠: AR, 中国医药上海化学试剂公司, 批号: 980805;

2) 氯化钠: AR, 沈阳试剂厂, 批号: 060120;

3) 蒸馏水: 沈阳农业大学动物医院相关实验室;

4) LH 放免药盒: 天津九鼎医学生物制品有限公司, 批号: S10950178;

5) FSH 放免药盒: 天津九鼎医学生物制品有限公司, 批号: S10950177;

6) Prog 放免药盒: 天津九鼎医学生物制品有限公司, 批号: S10950183。

1.3 试验器械

无菌注射器(5 mL)、输液器(带针)、带盖塑料离心管(1.5、5 mL)、止血带、脱脂棉、记号笔、天平、微量移液器(量程分别是: 5~50、20~200、50~1 000 μ mL)、小烧杯、100 mL 定量瓶、药匙、玻璃纸、量筒(10、50、100、1 000 mL)、胶带、玻璃棒、试管刷等。

1.4 试验方法与步骤

1) 促黄体生成激素的测定(LH 放免药盒法)^[1-2]。

①药盒组分。标准品: 7 瓶, 1 mL/瓶, 0.5、10、20、40、100、200 U/mL; 质控血清: 1 mL/瓶, 2 瓶; 抗体: 10/20 mL/瓶; 标记物: 10/20 mL, 1 瓶; 分离剂: 25/50 mL/瓶。分析药盒中试剂均应 2~8 $^{\circ}$ C 保存, 有效期内稳定。

②步骤。快速检测法, 采用血浆标本, 经标准静脉穿刺术采集全血, 尽快分离血浆, 按表 1 进行操作。

2) 促卵泡素的测定(FSH 放免药盒法)^[2]。

①药盒组分。质控血清: 1 mL/瓶, 2 瓶; 抗体: 10/20 mL/瓶; 标记物: 10/20 mL/瓶; 分离剂: 25/50 mL/

收稿日期: 2020-05-13

张 凯, 男, 1982 年生, 硕士, 兽医师。

瓶。分析药盒中试剂均应 2~8 ℃保存,有效期内稳定。

②步骤。快速法,采用血浆标本。

3)孕酮的测定(Prog 放免药盒法)。

①药盒组分。每 1 mL 标记物所含总放射性< 5.0 KBQ。分离剂:1 瓶×50/100 mL,用前摇匀。分析药盒中试剂均应 2~8 ℃保存,有效期内稳定。

②步骤。采用血浆标本,经标准静脉穿刺术采集全血,尽快分离血清,按表 2 进行操作。

2 结果与分析

2.1 促黄体生成激素

从表 3 和图 1 可以看出,若仅以发情前期、发情期 LH 的数据去推断母犬的排卵情况是很难的,因其变动范围较大。母犬在发情前期和发情期 LH 呈脉冲式分泌,所以其准确峰值很难捕捉到。

2.2 促卵泡激素

从表 4 可以看出,不同个体血浆中 FSH 水平差

别较大,范围较宽。

2.3 孕酮

通过以上数据观察孕酮值在发情前即将结束时(第 11 天)开始升高,然后在发情期(13~24 d)孕酮值迅速升高,并且出现峰值。孕酮值最大的特点是在发情期就开始升高,到排卵前后继续升高。综上所述,孕酮的含量变化是比较稳定且有规律,而 FSH、LH 的测定值很不稳定,其规律不易把握(表 5)。

3 讨论

3.1 促黄体生成激素的浓度及测定意义

确切地说,由于雌孕激素的下降,脑垂体分泌 FSH(卵泡刺激素)的抑制解除,FSH 开始上升,促使一组初级卵泡发育,新一批卵泡所产生的雌激素逐渐上升,子宫内膜逐渐增厚,此时 LH 水平在卵泡期逐渐缓慢升高^[3]。

表 1 LH 放免药盒法操作表

管别	样本	抗体	温育条件	标记物	温育条件	分离剂/ μL	分离方法
总 T	—	—	充分混匀	200	充分混匀	—	—
NSB	“0”200	水 200	置 37 ℃	200	置室温	500	充分混匀,4 ℃
标准管	200	200	0.5 h	200	1.5 h	500	3 600 r/min 离心 20 min
标本管	200	200		200		500	弃上清测量沉淀物

表 2 孕酮放免药盒法操作表

管别	样本	抗体	温育条件	标记物	分离剂/ μL	分离方法
总 T	—	—	充分混匀	200	—	—
NSB	“0”200	水 200	置 37 ℃	200	500	充分混匀,4 ℃
标准管	200	200	0.5 h	200	500	3 600 r/min 离心 20 min
标本管	200	200		200	500	弃上清测量沉淀物

表 3 LH 测定值

采样天数/d	编号(犬)						mg/mL
	1	2	3	4	5	6	
1	4.25	3.42	2.00	4.40	7.40	7.66	
3	6.70	3.56	3.85	6.73	9.50	8.87	
5	4.15	4.32	2.19	3.43	7.57	6.16	
6	7.11	4.76	5.91	3.93	8.12	8.65	
7	10.82	4.37	116.45*	3.30	6.22	9.57	
8	9.22	4.02	4.25	246.11*	8.21	5.69	
9	200.90*	106.21*	6.31	2.82	18.81*	11.77*	
11	8.79	8.10	4.31	4.29	9.52	5.00	
13	2.93	7.26	9.58	6.10	9.75	8.59	
17	5.26	3.89	4.81	6.82	7.95	7.44	
24	4.72	3.58	3.71	6.83	7.18	9.06	

注:“*”表示显著增加($P < 0.05$),下同。

3.2 促卵泡激素的浓度及测定意义

FSH 波动与卵泡生长波一致,其波动的大小与卵泡发育的数量及大小有关^[4]。FSH 在卵泡期随着卵泡的发育而分泌量逐渐增多,发情时达到峰值,排卵后降至低水平,然后又呈现较平稳的脉冲式分泌。但在发情周期中,血浆 FSH 水平升高比 LH 早,可能是因为黄体期 GnRH 分泌频率和量都相应减少。这种持续而又缓慢的 GnRH 的刺激有利于 FSH 的分泌,所以在黄体的晚期和卵泡的早期 FSH 水平即升高^[5]。

3.3 FSH 与 LH 含量的比例及其意义

正常情况下,FSH 与 LH 在血液中达一定比例时引起排卵,可以较好评估卵巢储备、卵巢反应性以及排卵能力^[6]。由于试验经费等原因,没有进行深入的对比研究。这部分是笔者个人认为需要兽医工作者加强研究总结的地方,因为我们对犬正常发情期各段内 FSH/LH 没有测定和记录,所以很难说明

其深远意义。

3.4 孕酮的浓度及测定意义

通过测定血浆中孕酮的水平,可以判断卵巢上是否有黄体,从而可以初步判断母犬的繁殖状态。建议 2~4 d 后再做 1 次样品检测,来确保孕酮含量在持续上升以及有排卵。排卵后黄体形成,分泌多量孕酮(黄体酮),比排卵前的孕酮明显增加,一般认为 ≥ 5 mg/mL 时为排卵。

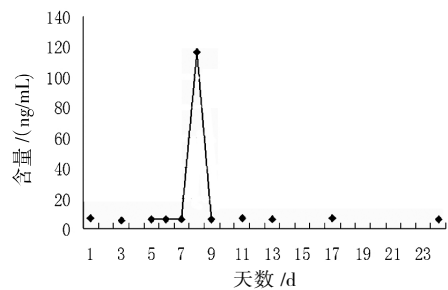


图 1 母犬发情期促黄体生成素含量变化曲线

表 4 FSH 测定值 mg/mL

采样天数/d	编号(犬)					
	1	2	3	4	5	6
1	6.50	7.06	2.40	3.84	3.72	2.58
3	4.32	1.85	3.13	2.74	3.59	4.13
5	4.11	4.65	5.12	4.34	3.71	119.27*
6	5.13	4.66*	4.53	6.64*	2.86	1.77
7	119.61*	2.49	4.22	3.94	3.27	3.65
8	3.68	2.35	4.51	2.79	5.90*	3.66
9	1.89	1.24	4.00	2.25	4.24	4.27
11	2.71	4.76	5.26*	2.26	5.45	3.75
13	4.22	4.92	5.22	2.79	4.13	4.50
17	3.74	3.40	3.40	3.66	1.79	4.99
24	3.30	6.83	5.10	4.55	5.65	3.76

表 5 P4 测定值 mg/mL

采样天数/d	编号(犬)					
	1	2	3	4	5	6
1	0.110 0	0.1121	0.513 0	0.118 7	0.141 5	3.771 4
3	0.274 3	0.2788	0.000 0	0.151 8	0.316 1	10.317 2
5	0.288 9	0.2651	0.154 8	0.000 0	0.544 5	7.218 7
6	0.531 2	0.5863	0.234 8	0.567 9	0.380 5	1.828 5
7	0.244 9	0.5274	0.470 1	0.312 4	0.625 9	3.396 7
8	0.230 3	0.4708	0.483 3	0.157 0	0.601 0	2.139 1
9	0.152 5	0.2341	1.063 0	0.110 5	0.812 4	0.653 7
11	0.439 0	1.0552	0.812 4	0.121 5	0.550 9	0.355 6
13	1.191 0	2.6074	2.341 3	0.171 1	1.524 0	1.492 9
17	3.334 6	3.2827	4.287 8	1.743 6	3.247 8	4.093 4
24	12.663 4*	9.168 3*	5.561 9*	3.886 8*	11.252 5*	6.119 8