



犬促甲状腺激素 (TSH, thyrotropin)



甲 甲状腺功能减退是一种犬类常见的内分泌紊乱性疾病（综述见参考文献1）。主要表现为甲状腺素（T4）和三碘甲状腺氨酸（T3）缺乏，该两种激素均由甲状腺分泌。对犬类而言，原发性甲减是该疾病最常见的形式，其主要

诱因是由淋巴性甲状腺炎或先天性甲状腺萎缩导致的甲状腺损坏所致。

相比于人类，通常情况下对狗进行确诊非常困难。临床上基于病患的临床表征、甲状腺功能测试结果和甲状腺激素替代治疗的反应情况三个方面对甲减进行诊断。其中，甲减的临床表征往往是非特异的并且具有不确定性。在甲减病犬中通常可以观察到一些皮肤病学和代谢方面（如嗜睡、体重增加、运动不耐受以及寒冷不耐受等）的表征变化。低外周循环总T4浓度可提示甲减。然而，为了更可靠地评估犬甲状腺功能，应该将总T4、游离T4（由平衡透析法进行测定）和TSH进行联合检测。原发性甲减病犬会出现预期的低总T4和游离T4浓度，同时伴有高TSH浓度。此外还可以对甲状腺球蛋白抗体进行检测，因为甲状腺球蛋白抗体的存在可提示淋巴性甲状腺炎，该疾病可进一步导致甲减的发生。

犬TSH的生化性质

TSH属于糖蛋白激素家族，该激素家族还包括促黄体生成素（LH），促卵泡激素（FSH）和绒毛膜促性腺激素（hCG）。该类激素均由 α 和 β 两个亚基通过非共价连接而成。

该激素家族的四种激素均含有相同的 α 亚基。人类与犬类的 α 亚基具有73%的同源性。犬类的 α 亚基由96个氨基酸组成，较人类的 α 亚基要长4个氨基酸。犬类的 α 亚基的计算分子量为10693Da。与人类的 α 亚基类似，犬 α 亚基也含有两个潜在的N端糖基化位点（分别为56和82号氨基酸残基）和5个分子内二硫键（2）。

β 亚基是激素特异性的。犬与人类的TSH β 亚基高度同源（91%），均由118个氨基酸组成，并含有6个分子内的二硫键。犬TSH β 亚基的计算分子量（蛋白部分）为13517 Da。两种TSH均仅含有一个潜在的N端糖基化位点（23位氨基酸残基）。此前的报道显示，犬TSH β 亚基的81位氨基酸存在两种等位基因变异（缬氨酸和丙氨酸）（3）。

用于开发犬TSH 定量免疫检测分析系统的单克隆抗体和重组抗原

HyTest提供三株单抗（分别为1CT1，7CT8和11E4cc），可用于开发灵敏特异的犬TSH免疫检测分析系统。三株单抗均由天然人TSH抗原免疫而来，可以识别TSH β 亚基的不同表位。同时，这些抗体可以识别犬血清中的天然犬TSH以及重组犬TSH抗原。通过对人 LH，FSH和hCG的交叉反应研究，我们确定该三株单抗与其他糖蛋白激素不存在交叉反应。

此外，我们还提供由哺乳动物细胞表达的重组犬TSH抗原。

单克隆抗体

犬TSH夹心免疫检测分析系统的建立

我们推荐两组单抗配对11E4cc-1CT1 和 7CT8-1CT1，可用于开发检测犬血清样本中TSH的夹心免疫检测分析系统。我们用该两组配对建立的内部夹心免疫检测分析系统的校准曲线如图1所示。

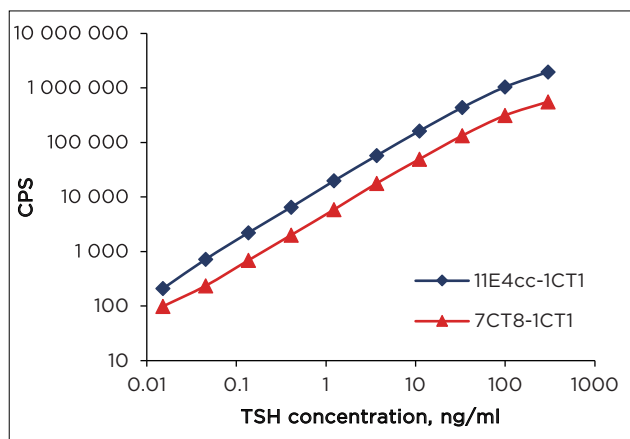


图1. 单抗配对11E4cc-1CT1 和 7CT8-1CT1的校准曲线。该系统基于链霉亲和素包被的96孔板(PerkinElmer)。捕获抗体11E4cc 和 7CT8 均标记了生物素。检测抗体1CT1标记了钨螯合物。校准品为重组犬TSH抗原。

我们还用两组推荐配对建立的内部免疫检测分析系统对排除甲减（10例）和确诊甲减（13例）的犬血清进行了TSH测定。如图2所示，甲减病患的TSH浓度的中位数显著高于健康群体。

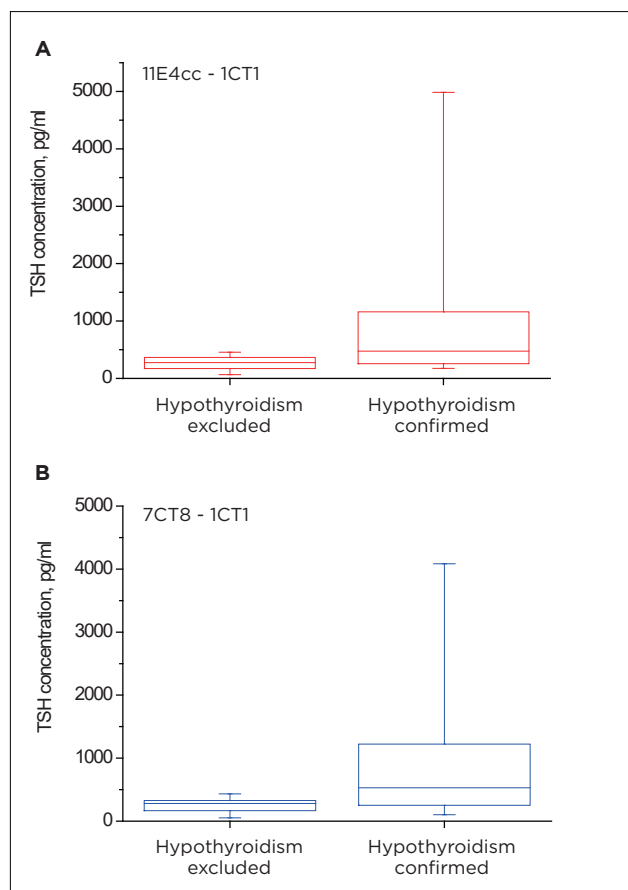


图2. 基于11E4cc-1CT1和7CT8-1CT1的免疫检测分析系统的健康群体（n=10）和甲减病犬(n=13)血清样本TSH浓度测定结果。结果如箱须图所示。箱体中横线代表中位数，箱体则代表25%和75%的百分位数，同时须端代表最大值和最小值。

ELISA

所有单抗均可以在直接ELISA平台中识别重组犬TSH抗原。单抗1CT1的滴度曲线如图3所示。

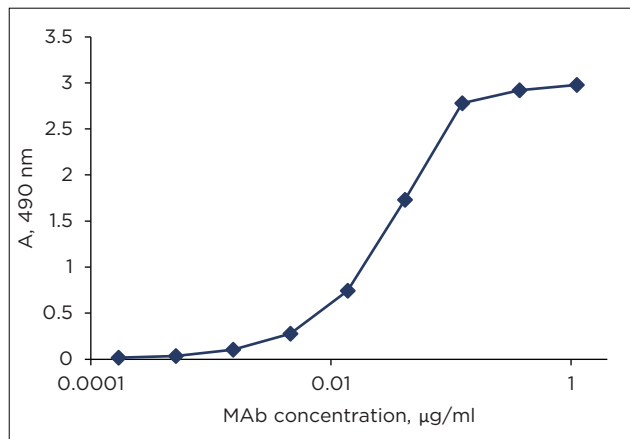


图3 单抗1CT1的滴度曲线。抗原为重组犬TSH (0.03 μg/孔)。

重组犬TSH

我们提供的重组犬TSH抗原由哺乳动物细胞通过α和β亚基共表达而得。β亚基的81号氨基酸为丙氨酸。两条亚基均不含额外的标签。TSH抗原通过亲和层析从条件培养基中纯化。纯化后的浓度大于90%，可能含有游离的β亚基。

我们通过还原性SDS-PAGE电泳对重组犬TSH的纯度进行了分析 (图4, 条带1)。上方的条带对应为α亚基, 下方条带则对应为β亚基。凝胶中亚基均由质谱分析所鉴定。

TSH亚基在还原性和非还原性条件下电泳的迁移率和相对位置均有所不同。在非还原性下, 可以观察到两条主要的条带, 和一条较小的条带。通过使用特异识别TSHβ亚基的单抗11E4cc和特异识别人hCG的单抗77F12 (货号2H8, 和犬TSHα亚基有轻微交叉反应), 在WB平台中对TSH亚基进行了鉴定。结果显示, 有两条条带对应为犬TSH的β亚基, 一条单一条带对应为α亚基 (图5)。

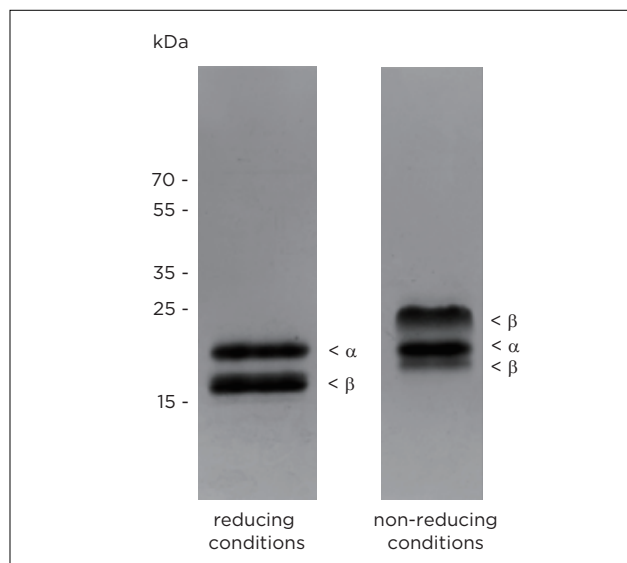


图4. 重组犬TSH的SDS电泳结果。用10-20%的SDS梯度凝胶电泳对4 Qg纯化后的TSH抗原进行分析, 其中条带1为还原性条件, 条带2为非还原性条件。蛋白条带采用考马斯亮蓝 (R-250) 进行染色。

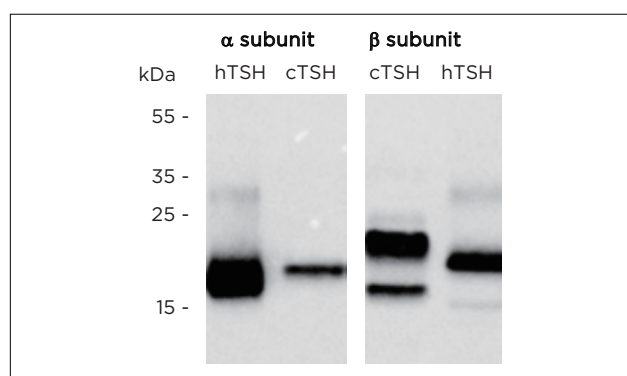


图5. 蛋白免疫印迹中重组犬TSHα和β亚基的检测结果。分别将重组犬TSH和天然TSH (人TSH作为标准参考) 以1μg/泳道的量经10-20%SDS非还原性梯度凝胶电泳后转移至硝酸纤维素膜。α亚基的条带用可识别α亚基的单抗 (货号2H8, 克隆77F12) 进行染色。β亚基的条带用可识别β亚基的单抗 (货号2H8, 克隆11E4cc) 进行染色。

订购信息

单克隆抗体

产品名称	货号	克隆号	亚型	应用
促甲状腺激素	2TS11	1CT1	IgG1	EIA, 非还原性WB
		7CT8	IgG1	EIA
促甲状腺激素, 体外生产	2TS11cc	11E4cc	IgG1	EIA, 非还原性WB

抗原

产品名称	货号	纯度	来源
重组犬促甲状腺激素	8CTS5	>90%	哺乳动物细胞

参考文献

1. **Mooney CT.** Canine hypothyroidism: a review of aetiology and diagnosis. N Z Vet J. 2011 May;59(3):105-14.
2. **Yang X, McGraw RA, Ferguson DC.** cDNA cloning of canine common alpha gene and its co-expression with canine thyrotropin beta gene in baculovirus expression system. Domest Anim Endocrinol. 2000 May;18(4):379-93.
3. **Yang X, McGraw RA, Su X, Katakam P, Grosse WM, Li OW, Ferguson DC.** Canine thyrotropin beta-subunit gene: cloning and expression in Escherichia coli, generation of monoclonal antibodies, and transient expression in the Chinese hamster ovary cells. Domest Anim Endocrinol. 2000 May;18(4):363-78.