

转移因子

与临床应用

霍保来 主编

学术期刊出版社

转移因子与临床应用

霍保来 主编

学术期刊出版社

转移因子与临床应用

霍保来 主编

责任编辑 陈 凯

•

学术期刊出版社出版

(北京海淀区学院南路86号)

北京人民广播电台

1988年3月第一次印刷 14.125印张

印数: 0001—2000 字数25万

标准书号: ISBN7—80045—009—0/R·3

定价: 5.60元

主 编 霍保来

编 委 王如璋 刘晓峰 王惠芳 吴恩融

邹昭芬 吕晓林 于奎一

2677/16

序

转移因子的研究开始于40年代，70年代初期方在临床试用。随着近年来免疫学的进展，对转移因子的作用机理的研究更加深入。由于证实了转移因子可以在种属之间传递，致使动物转移因子可用以治疗人体疾病，从而解决了来源问题，扩大了临床应用的范围，特别是在抗病毒感染方面，国内外已基本上有了明确的认识，积累了不少有参考价值的资料。70年代后期，我国开始了以动物脾脏为来源的非特异性动物转移因子的研究工作。北京大学医院临床免疫研究室等单位，在研究正常人转移因子的基础上，对非特异性牛、猪及羊等动物的类似物质，进行了多年的分析比较，积累了大量的基础和临床资料。现将我们多年来的分析研究、经验总结以及国外研究最新动态的资料，以非特异性牛转移因子资料为主，编著成册，意在推动对转移因子的研究和扩大临床应用。

虽然我们尽了很大努力，希望把本书的编著和翻译工作搞好，但由于水平所限，错误和不当之处请多加指正。在本书编写过程中责任编辑陈凯同志提了不少宝贵意见在此表示感谢。

编 者

目 录

序

第一部分 实验室分析与研究

- 1.1 牛转移因子的研制及临床应用 霍保来 (3)
- 1.2 介绍一种转移因子的定量新方法——转移因子的活性与含量测定
..... 霍保来 刘晓峰 王惠芳 杨振荣 张学昆 高淑玲 吴恩融 (8)
- 1.3 正常人和动物的转移因子对兔的红细胞的影响
..... 霍保来 张学昆 (10)
- 1.4 正常人和动物的转移因子的抗原性测定及比较
..... 霍保来 刘亚平 谢玉红 张学昆 (11)
- 1.5 正常动物转移因子对小鼠腹腔 M_ϕ 中吞噬功能的测定
..... 孙达梅 邹家玉 范维崢 刘建民 霍保来 (12)
- 1.6 正常动物转移因子对小鼠腹腔 M_ϕ 表面 C_{3b} 受体的影响
..... 邹家玉 孙达梅 范维崢 刘建民 霍保来 (14)
- 1.7 牛转移因子对小鼠腹腔巨噬细胞免疫功能的影响
..... 邹家玉 孙达梅 范维崢 刘建民 刘跃祥 霍保来 (18)
- 1.8 转移因子对小鼠脾细胞的免疫调节作用
..... 朱晓云 邵 柏 龙振洲 霍保来 张学昆 (24)
- 1.9 牛脾和人扁桃体转移因子的高压液相色谱的初步分析
..... 姜云庆 郭雨川 霍保来 (30)
- 1.10 牛脾转移因子制剂的生化分析 刘兆乾 霍保来 (36)
- 1.11 不同组织来源的转移因子的初步生化分析与比较 姜云庆 (48)
- 1.12 几种转移因子的微量元素分析报告 王秋萍 翁钧渭 (60)
- 1.13 关于牛转移因子遗传毒性的鉴定结果 北京医学院卫生系毒理教研室 (61)

第二部分 转移因子的临床研究

- 2.1 转移因子的临床应用 霍保来 (65)
- 2.2 牛脾转移因子治疗过敏性鼻炎 100 例的临床观察
..... 吕晓霖 马丹加 熊小兵 霍保来 吴恩融 王惠芳 (68)
- 2.3 牛脾转移因子治疗乙型病毒性肝炎的疗效观察
..... 吴晶新 胡肇衡 苗淑娟 刘治中 霍保来 吴恩融 (72)
- 2.4 支气管哮喘的免疫治疗 谢致民 汪淑担 史桂昌 (76)
- 2.5 牛脾转移因子治疗复发性口疮 林秉诚 (79)
- 2.6 牛脾转移因子治疗流行性腮腺炎的 21 例观察 张令文 (81)

- 2.7 牛脾转移因子治疗各种病毒性皮肤病的报告
.....王玉英 陈学荣 徐敏丽 李世荫 (83)
- 2.8 牛脾转移因子治疗异位性皮炎34例临床报告..... 王玉英 陈学荣 李世荫 (87)
- 2.9 10例再生障碍性贫血病人应用转移因子治疗疗效观察
.....范敏华 王良绪 计惠玲 朱吉禹 马树俊 龙振洲 郝正梅 (90)
- 2.10—1 免疫刺激剂转移因子、胸腺肽对精神分裂症患者免疫功能的影响
- 2.10—2 免疫调整剂治疗精神分裂症的研究
.....谢东泽 许天宏 王天保 杜孝元 霍保来 吴恩融 (94)
- 2.11 转移因子对精神分裂症患者 IgE 血症的影响
.....谢东泽 薛国维 王葆莉 霍保来 (96)
- 2.12 转移因子对95例皮肤病的疗效观察.....李英敏(113)
- 2.13 牛转移因子治疗精神分裂症37例临床观察
.....谢东泽 王天保 霍保来 杜孝元 吴恩融(114)
- 2.14 过敏性鼻炎的免疫治疗.....吕晓霖
马丹加 熊小兵 霍保来 吴恩融 王惠芳 马树俊 龙振洲 朱吉禹(117)

第三部分 译 文

-霍保来译 王如璋校
- 3.1 转移因子免疫调节活性的新发现.....H.S.Lawrence W.Borkowsky(127)
- 3.2 牛转移因子的 KLH (钥孔蠔血兰蛋白) 对人的皮肤反应性转移
..... Denis Burger(131)
- 3.3 含转移因子的白细胞提取物透析液在兽医上的展望.....P.H.Klesius [美](134)
- 3.4 牛免疫应答和产生转移因子的动力学.....B.Lesourd [法](139)
- 3.5 白细胞移动抑制试验的临床应用(测定转移因子效能及
预测临床疗效的新方法)H.H.Fudenberg [美](144)
- 3.6 口服牛转移因子治疗高 IgE 综合症.....J.F.Jones [美](151)
- 3.7 白细胞透析液(转移因子)在日本大阪的临床应用.....K.A.Kash [日](154)
- 3.8 转移因子与免疫核糖核酸D.Viza [法](159)
- 3.9 猪脾细胞透析液增加鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力减低
前列腺素水平.....R.Ashorn [芬兰](163)
- 3.10 白细胞提取物透析液中的胸腺素 α_1 存在的免疫化学及
物化证据.....G.B.Wilson [美](167)
- 3.11 特异性牛转移因子治疗疱疹感染.....D.Viza [法](174)
- 3.12 抗原特异性转移因子治疗疱疹病毒感染.....J.M.Dwyer [美](180)
- 3.13 人转移因子的作用机制——研究结核菌素特异性抗原释出
的转移因子的认识.....G.B.Wilson [美](185)
- 3.14 应用白细胞提取物透析液治疗肺癌及慢性气管炎.....J.Hainaut [法](193)
- 3.15 白细胞提取物透析液中的胸腺素 α_1 样物质.....C.H.Kirkpatrick [美](196)

第四部分 第五届转移因子国际研讨会论文摘要

(1986年11月10日~13日, 捷克斯洛伐克)

.....霍保来译 王如璋校

- I. 转移因子的性质、分子结构及活性增强技术.....(201)
- II. 白细胞透析物、单核细胞及细胞免疫应答效应细胞的作用机理.....(204)
- III. 白细胞透析物及其组分在动物机体内的反应.....(208)
- IV. 白细胞透析物的实验性免疫治疗.....(212)

第一部分

实验室分析与研究

1.1 牛脾转移因子的研制及临床应用

霍保来

(北京大学医院临床免疫研究室)

摘要: 自1982年开始,北京牛脾转移因子协作组对牛脾制备的非特异性转移因子进行了一系列的实验分析及临床研究,并通过与人脾转移因子的比较,认为牛脾可以做为大规模制备转移因子的材料,以满足临床需要。其中实验室研究包括:(1)牛脾转移因子(BTF)和人脾转移因子(HTF)生化分析比较;(2)对小鼠巨噬细胞吞噬功能的影响;(3)免疫活性在种属间传递的研究;(4)遗传毒性的检查;(5)各种安全试验。结果表明BTF和HTF具有一致性。临床应用包括:带状疱疹、流行性腮腺炎、疱疹性角膜炎、精神分裂症及慢性支气管炎等。其临床疗效较为满意,而且BTF比HTF对人更安全。

自从Lawrence提出转移因子以来,近四十年的实验室研究及近十几年的临床试用表明,转移因子具有调节受者对特定抗原的细胞介导免疫能力,亦能增强受者非特异性细胞介导免疫功能。转移因子对免疫缺损病、自身免疫性疾病及病毒感染等取得了比较有希望的疗效。

目前国内外临床应用的转移因子均取自人的白细胞或淋巴组织。由于材料来源缺乏,影响了临床上的广泛应用,而且人体材料有携带肝炎抗原的危险。因此,应解决大规模制备转移因子材料的来源问题,满足临床应用的需要。人们早期曾认为转移因子免疫能力的转移具有种属特异性,即不能通过种属屏障从一种动物转移给另一种动物。近年来一些学者的研究结果相继证明,在不同种属的哺乳动物之间,可以转移细胞介导免疫能力。Burger证明,BTF可以把对KLH的特异性免疫能力从牛体传递给未接触过该抗原的人体;Klesius氏证明,用BTF可以给兔、狗、猴转移抗原特异性DTH反应;Boucheix氏证明,鼠脾转移因子可以将细胞介导免疫能力转移给人;Newell氏证明,用牛淋巴结透析液可以将抗原依赖性免疫能力转移给人。这些发现使以大型家畜为来源的转移因子用于治疗人体疾病成为可能,例如:Viza氏用特异性BTF治疗疱疹感染,Jones氏用BTF治疗高IgE综合症均取得一定疗效。

在以上成果的启示下,我们研制了非特性牛脾转移因子(BTF),并对其进行了各项分析及生物学测定,同时与人脾转移因子(HTF)进行了比较,进而在临床上用于多种疾病的治疗,其初步结果如下。

1.1.1 牛脾转移因子的制备及其特性

(1) 制取方法及质量标准

牛脾转移因子的制备流程是根据Lawrence提出的方法并稍加改变,即用健康的、未经

免疫的牛脾为原料，经清洗、切碎，加二倍无热原的蒸馏水，再经冰冻及融化三次以上，使白细胞破裂；此混悬液被离心沉淀后，取上清液装入一定型号的透析袋中，再置入一定量的生理盐水中，然后一同放在冰箱内透析24小时。透析液经G6微孔滤器除菌后，分别灌入安瓿中，冻干成粉剂，封口备用。

质量标准如表(1.1—1)所列。1单位BTF表示该产品中含有1mg多肽；多肽含量以Folin-酚法测定。

表 (1.1—1) 牛转移因子的质量标准

1	外观：白色或淡黄粉状	7	致热性：阴性
2	易溶于水	8	湿度：<3%
3	pH范围：5.60—6.50	9	致过敏性：阴性
4	蛋白质：阴性	10	活性：达到标准
5	微生物：阴性	11	核糖含量：80μg/单位
6	毒性：阴性	12	多肽含量：1mg

(2) 牛转移因子的检验分析

① 生化测定

i. 样品上Sephadex G25柱在8℃分离、洗脱速度2.2ml/10秒，操作压50.0厘米。BTF及HTF均可分得5—6个峰。

ii. 用Folin-酚法、地衣酚法及二苯胺法，分别对样品和经Sephadex G25分离所得的各组分进行测定证明，BTF和HTF含有多肽、核苷酸等物质。

iii. 紫外光谱图分析，可以看到：BTF $\lambda_{\max} = 270.8\text{nm}$ ；HTF $\lambda_{\max} = 253\text{nm}$ 。

iv. 游离氨基酸分析。用(Beckman)121MB氨基酸分析仪及DNS氏层析法分析和测定游离氨基酸的种类及含量。结果表明，BTF和HTF均至少含有18种氨基酸，其中Ser、Glu、Gly、Ala、Lys及Arg的含量较高。

v. 硅胶薄层层析结果表明，样品中含有次黄嘌呤及鸟嘌呤。

vi. SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分析结果表明，两种制品均含有六种以上不同分子量的含肽类物质，分子量大多在3000以下。显示样品为成分比较复杂的小分子混合物。

vii. 用高效反相液相色谱法分析，在不同波长下检测色谱行为，采用C-18反相柱和甲醇-水梯度洗脱。证明HTF至少含有20个组分，BTF至少有10个组分，二者在组成上同为分子量小于10000的小分子物质的混合物。用甲醇-水梯度洗脱分离可获得较好的分离效果，说明转移因子制剂在各组分结构上有一定的相关性，且都没有很大的疏水性。

② 对小鼠腹腔巨噬细胞免疫功能的影响

实验结果表明，BTF对小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能有显著的增强作用；对其表面C_{3b}受体有所激活，提高了Y_h花环形成率。BTF经30分钟的80℃热处理后，免疫活性丧失。

③ 用特异性花环形成细胞法(S-RFC)、直接空斑形成细胞法(PFC)和Con-A活化脾细

胞³H-T 掺入法, 对 BTF 和 HTF 在小鼠体内和体外的非特异性免疫增强活性进行观察的结果表明:

i. 两种制品对 Con-A 引起的脾细胞增殖及 S-RFC 均有促进作用。高浓度时未发现有毒性作用。

ii. 体外使用高浓度对 Con-A 引起的脾细胞增殖有一定的抑制作用。

iii 对 Con-A 引起的脾细胞增殖及 S-RFC 的促进作用是抗原依赖性的, 类似于胸腺因子和白细胞介素对成熟的 T 细胞的作用。

iv. BTF 及 HTF 对小鼠的非特异性免疫增强作用没有种属特异性。

v. 用小鼠脾细胞 S-RFC 法和 ³H-TDR 掺入法, 可以做为转移因子的非特异性免疫活性的检验方法。

④ 抗原性的测定

用 BTF 和 HTF 对兔进行致敏试验, 免疫完结后, 分别取其血清通过免疫电泳进行测定。结果表明二者均无抗原性。并对长期接受转移因子治疗的患者取血进行免疫检测, 也未发现对转移因子的抗体产生。

⑤ BTF 的遗传毒性鉴定试验

用 V₇₉ 细胞作 6-TG 抗性试验, 结果表明, BTF 在所用的检测剂量范围内, 对哺乳类动物细胞 V₇₉ 未显示致突变作用。

1.1.2 牛转移因子的临床应用

BTF 已在多种疾病的治疗上试用, 包括病毒感染、过敏性疾病、免疫性疾病及精神分裂症等, 现举例分述:

① 精神分裂症

用 BTF 和 HTF 分别对二组精神分裂症进行治疗, 并设对照组。BTF 治疗 37 例, 其中男 17 人, 女 20 人; 年龄 25 至 60 岁; 病程 4 至 20 年。HTF 治疗 19 例, 其中男 10 例, 女 9 例; 年龄 31 至 60 岁; 病程 6 至 19 年。治疗前后均做免疫学检查和精神科检查。全部采用盲法。

实验室检查包括 E 花环、自身花环、T₄ 细胞、免疫复合物、C₃、C₄ 及自身抗体。精神科检查则根据《精神病评定量表》。治疗是用转移因子进行皮下注射, 每周 2 次, 每次 2 单位, 八周为一疗程。治疗期间均未停药抗精神病药物。

治疗结果: i. 自身花环用药后增加, 有统计学意义。ii. HTF 和 BTF 对患者血清 IgE 水平的作用是双向的, 即高 Ig E 水平在用药后下降, 而低 Ig E 水平升高。iii. 治疗后临床症状有明显改善, 尤其是焦虑、情绪退缩和抑郁等症状的改善明显。

② 带状疱疹

BTF 治疗带状疱疹 38 例, 其中男 23 例, 女 15 例; 年龄 7 至 74 岁; 发病平均 4 天。对照组 13 例, 其中男 7 例, 女 6 例; 年龄 12 至 58 岁; 平均发病 3.7 天。治疗组每日或隔日皮下注射 1 单位; 对照组仅给安慰剂。

治疗结果: 平均皮损治愈时间是, 治疗组 8.1 天, 对照组 13.4 天; 平均全病程治疗组为 12.1 天, 对照组为 16.8 天。两组比较表明, 转移因子治疗可以缩短病程, 有统计学意义。

③ 疱疹性角膜炎

疱疹性角膜炎患者 15 人接受 BTF 治疗, 其中女 9 人, 男 6 人, 共 22 只患眼; 年龄 17 至 53

岁；病史7天至26年。平均每人注射转移因子14支。治愈9例，好转2例，无效2例，治愈复发2例。有效率73%，无效27%，复发率13%。

④ 流行性腮腺炎

流行性腮腺炎20例用BTF治疗。皮下注射每日1单位。所有接受治疗的病人均于一周内腮腺肿消退，无一例发生合并症。以往不用转移因子治疗的病人，大都需十天以上才消肿并有少数病人发生合并症。故认为BTF对腮腺炎有效。

⑤ 慢性支气管哮喘

慢性支气管哮喘41例接受BTF治疗，其中男16人，女25人；年龄22至56岁；病史4个月至4年。BTF皮下注射，每次1单位，每周2次，连续6个月。诊断及治疗效果根据1984年制订的标准。治疗前后均取血检查抗体水平，治疗后IgG、IgA及IgM水平较治前下降。治疗结果显效7例（17%），有效29例（71%），无效5例（12%）。

⑥ 过敏性鼻炎

56例过敏性鼻炎患者，病史2个月至20年，接受BTF治疗。皮下注射，隔日1次，每次一单位，20天为一疗程。治疗结果显效22例，有效21例，无效13例。有效率为76.6%。

⑦ 乙型病毒性肝炎

BTF治疗乙型病毒性肝炎与聚肌胞治疗相对照。慢迁乙型病毒性肝炎患者29例使用BTF治疗，患者年龄19至53岁，病程半年至5年；在另27例中，年龄21至54岁，具有同样病程，接受聚肌胞治疗。BTF皮下注射靠近鼠蹊淋巴结部位，每周2次，每次2单位，连用2至3个月。聚肌胞为皮下注射，每周2次，每次4单位连用2至3个月。治疗前后均做化验检查，包括HBsAg、抗HBs、HBeAg、及抗HBe；并检查DNA-P及DNA。

治疗结果：BTF治疗组29例，其中完成3个月治疗的19例，完成2个月治疗的10例。聚肌胞治疗组27例，其中完成3个月治疗的20例，完成2个月治疗的7例。BTF治疗组于治疗后HBsAg下降者4例；HBeAg阴转二次者5例，一次者为6例；抗HBe阳转者3例，DNA或DNA-P平均降低2.5至10倍（见表1.1—2）。

BTF治疗有效率为58.6%（10/29）。BTF或聚肌胞治疗后有一部分患者化验指标改善，在上述病例中BTF稍优于聚肌胞。

表（1.1—2） 慢迁乙型病毒性肝炎经BTF及聚肌胞治疗后化验指标的改变

组 别	治 疗 后 化 验 指 标				
	HBsAg ↓ (例 数)	HBsAg 阴转		抗 HBe 阳转 (例 数)	DNA 或 DNA-P
		2 次	1 次		
牛 TF	4/29	5/12	6/12	3	下降2.5至10倍
聚 肌 胞	2/27	12/21	2/12	2	无明显变化

⑧ 痛经

BTF用以治疗痛经。20名女病人，年龄18至26，19人未婚，1人已婚。其中严重痛经6例，中度痛经14例。BTF皮下注射，每周2次，每次1单位，连用1至3个月。近期疗效观察结果：显效4例（20%），月经期完全无痛；有效13例（65%），虽有痛但不需服用止痛药；无效3例（15%）。总有效率为85%。

1.1.3 讨 论

转移因子是一种细胞免疫调节剂和增强剂,70年代以来用于疾病的治疗,并被证明有一定疗效。研究证实,多种哺乳动物的白细胞内含有转移因子,并能在种属间传递。我们从1982年开始用牛脾制备非特异性转移因子,并进行了系统的实验室分析,随后在临床试用。在和人转移因子进行对比时,我们发现牛转移因子和人转移因子具有相似的生化结构性质、免疫药理和生物活性。经动物实验及人体试用均证实BTF冻干安瓿剂安全无毒、无副作用、无抗原性,不会引起过敏反应;对病毒感染疾病如带状疱疹、流行性腮腺炎等的疗效,与文献报道过的人转移因子的疗效相似;对过敏性疾病也有一定疗效。上述疾病目前缺少有效的药物,BTF值得进一步试用。用转移因子治疗精神分裂症在文献中尚未见报道过,而本组病例在症状改善方面却取得了可喜结果。这究竟是药物的作用还是其他因素所致,有待进一步观察。用牛脾为原料制备转移因子既可满足数量供应又无传染乙型肝炎的危险,而且疗效不亚于人转移因子。

参 考 文 献

- [1] 徐以敬等 1987 免疫学快报 7(3):55。
- [1] 霍保来 1986 中国免疫学杂志 2: 102—106。
- [3] Akashi, K.et al,1983 Immunobiology of TF 279.
- [4] Burger, D.R.et al. 1979 Ann.Ny.Acad.Sci.332: 236.
- [5] Klesius, P.H.et al,1977 Clin immunolpathy 8: 238.
- [6] Lawrence, H.S.1955 I Clin.invest.34: 219.
- [7] Lessnoed, B.et al. 1983 Regerence 203.
- [8] Newell, R.T.et al 1979 Immune Regu.In TF 161.

1.2 介绍一种转移因子的定量新方法 ——转移因子的含量测定

霍保来 刘晓峰 王惠芳

杨振荣 张学昆 高淑玲 吴恩融

(北京大学医院临床免疫研究室)

正常人转移因子的研究及临床应用在国内外已持续多年。近年来,动物转移因子也先后在国内外得到广泛的研究与应用。但是,转移因子的定量标准问题在国内外学术界仍有争论。在第四次国际转移因子学术讨论会上,各国学者各抒己见,对此问题未能科学地统一起来。到目前为止,各国转移因子定量方法分别以 5×10^7 、 5×10^8 、或 1×10^9 等细胞数提取物为一个单位。在近期全国第二次转移因子会议上,用751紫外分光光度计测定250nm吸收峰OD值,以OD值等于7或7.86作为一个单位,此法仍以细胞计数为定量依据。

我们认为以上诸法作为转移因子单位定量标准的依据,准确性差,缺乏科学性,给生产以及临床疗效的判断和合理用药带来不少困难,给药政部门对该品的质量控制带来很多不便。同时对于不同地区、不同批号的转移因子的研究分析与比较,也造成很大误差,而且缺乏现实意义。

近几年,我室在研究人和动物(牛、猪、羊等)转移因子的基础上,经过长期分析和比较,并根据学者们目前认为的转移因子作用的主要成份是多肽的观点,提出了新的转移因子的定量方法和定量标准。在制备工艺统一的前提下,肽的含量的多少与生物活性对机体的双向作用成比例变化。因此我们认为,用Folin-酚法测定转移因子的多肽含量和以多肽的含量1mg为一个单位,作为定量标准是比较合理的。这种以每mg多肽的含量为一个单位的定量方法及标准,对于转移因子的研究分析与比较,具有合理性和实用价值,更适合生产和临床的需要。这种定量方法可以把人和动物的转移因子的质量控制统一起来,实现标准化。这将进一步推动动物转移因子的研究 and 应用。

经过实践证明,这一方法是切实可行的。我们向国内外从事人和动物的转移因子的研究、生产和应用的学者推荐这一定量的新方法。

实验方法与步骤如下:

Folin-酚法测TF内多肽含量

① 原理

蛋白质(或多肽)分子中含有酪氨酸、色氨酸等能与Folin-酚试剂起氧化还原反应,生成蓝色化合物。蓝色的深浅与蛋白质的浓度成正比,可用比色法测定。

② 试剂

i. Folin-酚试剂A

- | | | |
|----------------------------------|-------|-------|
| 4% 无水碳酸钠溶液 | 25ml | } (a) |
| N/5 氢氧化钠溶液 | 25ml | |
| 2% 酒石酸钾钠($C_4H_4O_6KNa$)溶液 | 0.5ml | } (b) |
| 1% 硫酸铜($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)溶液 | 0.5ml | |

临用时将(a)与(b)按比例(50:1)混匀。

ii. Folin-酚试剂 B

将钨酸钠、($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$)100g、钼酸钠($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)25g、水700ml、85%磷酸50ml及浓盐酸100ml置于1500ml磨口圆底烧瓶中,充分溶解混匀后,接上磨口冷凝管,回流10小时;再加入硫酸锂150g,水50ml及溴液数滴(使呈微绿色),开口煮沸15分钟,驱除过量的溴;冷却后稀释至1000ml,过滤(滤液呈微绿色),贮于棕色瓶内。临用前用1N氢氧化钠溶液滴定,以酚酞为指示剂(由于试剂微绿,影响滴定终点的观察,可将试剂稀释100倍后再滴定)。根据滴定结果,将试剂稀释为相当于1N的酸(稀释一倍左右)。

iii. 牛血清清蛋白标准液

取牛血清清蛋白(标准品),50mg,精密称定,置100ml量瓶中,加N/10氢氧化钠溶液使溶解并稀释至刻度,再精密取出10ml,并稀释至50ml,得到含0.100mg的牛血清清蛋白的溶液。

iv. 样品液

取样品3支,置50ml量瓶中,加水溶解并稀释至刻度。使成每ml中约含60 μ g的溶液。

③ 操作

i. 标准曲线的制备

取大小相同的试管12支,按顺序精密加入牛血清清蛋白标准液0.00ml、0.10ml、0.20ml、0.40ml、0.60ml和0.80ml,一式两支;再依次精密加入水1.60ml、1.50ml、1.40ml、1.20ml、1.00ml和0.80ml。然后顺序精密加入Folin-酚试剂A4.0ml,摇匀。室温放置10分钟后,依次精密加入Folin-酚试剂B0.4ml,摇匀,上塞。再经30℃恒温水浴保温30分钟,冷却至室温后,在660nm的波长下测定吸收度。以吸收度为纵坐标,蛋白质含量为横坐标绘制标准曲线,即得。

ii. 样品测定

取相同的试管两支,精密加入样品液0.70ml和水0.90ml,再精密加入Folin-酚试剂A4.0ml,摇匀。室温放置10分钟后,再精密加入Folin-酚试剂B0.40ml,摇匀,上塞。再经30℃恒温水浴保温30分钟,冷却至室温后,在660nm的波长下测定吸收度。并在标准曲线上查得样品液中以多肽计算的转移因子含量。

④ 计算

$$\text{样品相当标示量的百分数} = \frac{\text{样品查得值(mg数)} \times 50 \times 100\%}{\text{样品取用量(ml数)} \times 3 \times \text{样品标示量}}$$