

利用羊抗鸡抗体检测鹅血浆中的抗体水平

黄运茂¹, 苏记良², 于迎春², 李孝伟², 施振旦²

(¹仲恺农业技术学院生命科学学院, 广东广州 510225; ²华南农业大学动物科学学院, 广东广州 510642)

摘要: 利用商品供应的山羊抗鸡抗体 ELISA 检测鹅血液中抗体水平的可行性。在相同条件下, 以羊抗鸡抗体作为第 2 抗体, 在 ELISA 分析中检测利用同一抗原免疫后鸡和鹅血浆样品中抗体水平。经过相同倍数梯度稀释的鸡和鹅血浆样品中, 所测到的鹅血样的 D450nm 值曲线在处理组和对照组均与鸡的 D450nm 值曲线变化趋势相同, 只是随血样的稀释倍数上升, 鹅血样 D450nm 值的下降速度较慢。结果表明只要反应条件适当, 抗鸡抗体可以作为第 2 抗体用于 ELISA 检测鹅血液中的抗体。通过抗原/血浆浓度梯度交叉试验, ELISA 中抗原的最适包被质量浓度为 100 μg/mL (150 μL/孔), 血样最佳稀释比为 1: 12 800。ELISA 测定所得鹅免疫试验中的抗体变化与理论预计结果一致, 与在鸡上的变化也类似。

关键词: 抗鸡抗体; 鹅; 抗体检测; 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

中图分类号: S852.4 文献标识码: A 文章编号: 1001-411X(2007)02-0095-04

Detection of Antibody Levels in Goose Serum Samples Using

Goat-Anti-Chicken Secondary Antibody

HUANG Yun-mao¹, SU Ji-liang², YU Ying-chun², LI Xiao-wei², SHI Zhen-dan²

(¹ College of Life Science, Zhongkai University of Agriculture and Technology, Guangzhou 510225, China;

² College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The present study evaluated the feasibility and validity of using a biotinylated goat-anti-chicken secondary antibody in the ELISA for the detection of antibody titres in goose serum samples. Goose samples serially diluted produced a similar decay pattern of D450nm values at a slightly slower rate than chicken samples. However, at dilution rates from 6 400 to 25 600, both chicken and goose samples yielded similar D450nm values, which also exhibited maximal deviation from basal values of negative control samples. Using goat-anti-chicken antibody as the secondary antibody in the ELISA, the optimal concentration of recombinant chicken inhibin fusion protein to coat the plate was determined to be 100 μg/mL (150 μL/well). Using these criteria of plate coating and sample dilution rate, samples from geese immunized against recombinant chicken inhibin fusion protein produced D450nm values, reflecting fluctuations of blood antibody levels in line with the theoretically changes after immunizations. The above results demonstrated that biotinylated goat-anti-chicken antibody could be used in ELISA to detect antibody levels in goose samples, provided that the samples be diluted at the rate between 6 400 and 25 600.

Key words: anti-chicken antibody; goose; detection of antibody levels; ELISA

酶联免疫吸附试验 (ELISA) 以其高度的敏感性和特异性以及操作的简便性被大规模使用于实验室、生产现场以及医学诊断^[1], 并且随着近十几年的不断发展和延伸, 其使用范围越加广泛, 作用也愈加重要。在鹅生殖内分泌的研究工作中, 由于国内外对鹅的研究比较少, 目前很难获得用于研究的抗鹅抗

收稿日期: 2006-10-27

作者简介: 黄运茂 (1976—), 男, 讲师, 博士; 通讯作者: 施振旦 (1964—), 男, 教授, 博士, E-mail: zdshi@scau.edu.cn

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (04205804); 仲恺引进优秀人才科研启动项目 (G2360232)

体,这给鹅样品 ELISA 分析造成了很大困难.直接制备抗鹅抗体需要大量人力、物力和时间,而市场上却很容易购得物美价廉的羊抗鸡抗体.因此,本试验设计用羊抗鸡抗体作为第2抗体,用于 ELISA 检测鹅和鸡血浆中的抗体水平,以此评价利用羊抗鸡抗体作为第2抗体检测鹅血液中抗体水平的可行性,建立鹅抗体水平的 ELISA 分析方法,为国内外类似研究工作提供借鉴.

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用处理组/对照组的鸡和鹅血浆样品分别来源于同一抗原的2组免疫试验,处理组免疫原为华南农业大学动物遗传与繁殖实验室构建和表达的鸡抑制素重组蛋白,含抑制素 α 亚基片段成熟肽N端1~106氨基酸残基^[2],对照组用等量的小牛血清蛋白(BSA).免疫原乳剂油相(100 mL)含4 mL司本80、2 mL司本85、94 mL 10号矿物油和2 g硬脂铝酸,水相含重组蛋白或BSA.试验在第1、22和45 d共进行3次免疫,抗原质量浓度分别为1.0、0.8和0.8 mg/mL.从试验第1 d开始每隔15 d翅下静脉采血1次($n=12$),用肝素钠抗凝;所采血样在3 h内离心分离血浆,4℃ 3 000 r/min离心20 min,样品冻存于-20℃,待抗体水平测定.除抗体水平检测所用血样为整个试验阶段采集的全部血样,其余所用鸡和鹅血浆样品均为试验第60 d的样品.

1.2 主要试剂

包被液为0.05 mol/L碳酸盐缓冲液(pH=9.6,含 Na_2CO_3 1.5 g/L和 NaHCO_3 2.9 g/L),包被抗原为纯化所得免疫原;封闭液为明胶($\varphi=0.1\%$)-PBS溶液(试验所用PBS pH=7.4);样品稀释液为PBS;洗涤液为Tween20($\varphi=0.6\%$)-PBS溶液;抗体稀释液为脱脂奶($\varphi=1\%$)-Tween20($\varphi=0.1\%$)-PBS溶液;底物缓冲液为四甲基联苯胺(TMB)无水乙醇溶液(1 mg/mL)和双氧水($\varphi=0.03\%$)的混合液,显色前等体积混合;终止液为 H_2SO_4 溶液($\varphi=2\%$).生物素化羊抗鸡抗体购于晶美生物工程有限公司.

1.3 方法

分别取鸡和鹅免疫试验处理组和对照组的血浆样品($n=8$)作相同倍数的稀释(1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800、1:25 600、1:51 200和1:102 400),在同样条件下作ELISA检测,比较2组测定结果,分析用羊抗鸡抗体检测鹅血液中抗体水平的可行性;之后随机取一鹅免疫试验处理组和对照组第60 d的血样,作如上梯

度稀释后,与不同质量浓度包被抗原(依次为150、100、50、25 $\mu\text{g/mL}$)作交叉反应,分析ELISA结果并确定抗原和样品的最佳稀释倍数;最后按抗原最佳包被质量浓度(100 $\mu\text{g/mL}$)和血样最佳稀释倍数(12 800倍),ELISA检测整个试验阶段鸡和鹅血液中抗体水平的变化(鸡的交叉反应结果未列出,血样稀释倍数为25 600倍).

ELISA条件:向酶标板孔中加入150 μL 含适量抗原的包被液4℃过夜,清洗后加200 μL 封闭液,37℃孵化1.5 h;清洗后加稀释样品100 μL ,37℃孵育1.0 h;清洗后加100 μL 二抗(生物素化羊抗鸡抗体,稀释比为1:1 000),37℃孵育1.0 h;清洗后加100 μL 链霉亲和素-辣根过氧化物酶(HRP,稀释比为1:1 000),37℃孵育1.0 h;清洗后进行TMB显色,并在终止反应后测 $D_{450\text{ nm}}$ 值.

2 结果

2.1 鸡与鹅血浆样品的梯度稀释及比较

在同样的ELISA反应条件下,鸡和鹅对照血样在稀释倍数较低时(鸡为100~12 800倍,鹅为100~6 400倍), $D_{450\text{ nm}}$ 随着稀释倍数的增大而快速下降,曲线几乎成一条斜线(图1);在稀释倍数较高时(鸡>12 800倍,鹅>6 400倍), $D_{450\text{ nm}}$ 下降到最低($D_{450\text{ nm}}\approx 0.1$),并保持稳定,曲线均表现趋于平直.结果显示,鸡和鹅对照组血浆样品梯度稀释曲线变化趋势一致,前者变化趋势要比后者稍快,即曲线斜率稍大.这种斜率差异在处理组中也同样存在(图1).在处理组中,鸡和鹅血样 $D_{450\text{ nm}}$ 不论是在低倍还是高倍稀释时均随稀释倍数增大而快速下降,即使是在对照组的值稳定在最低值时也一样,即两者的曲线整个成一条斜线,只是鹅的斜率比鸡的稍小.

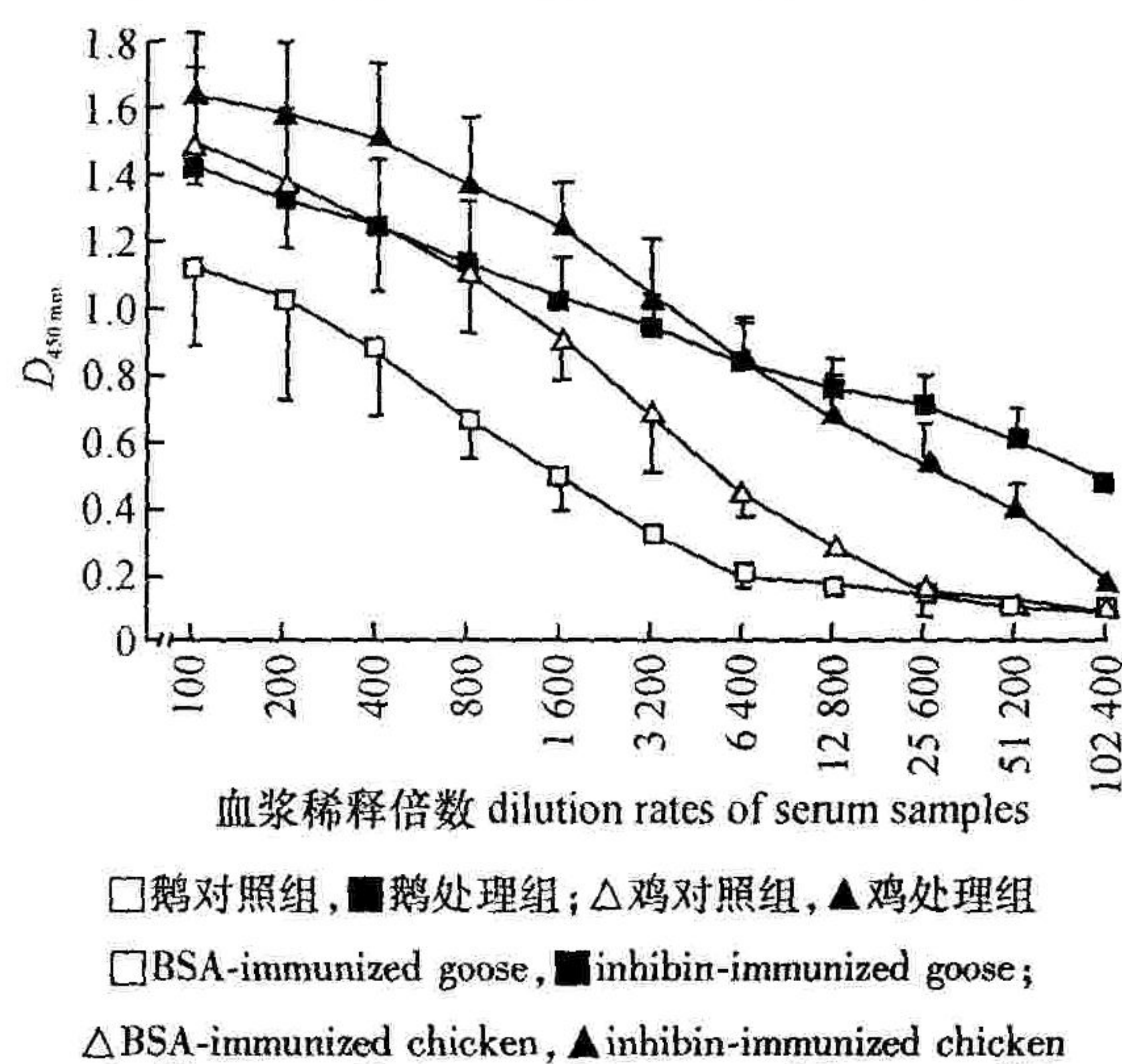


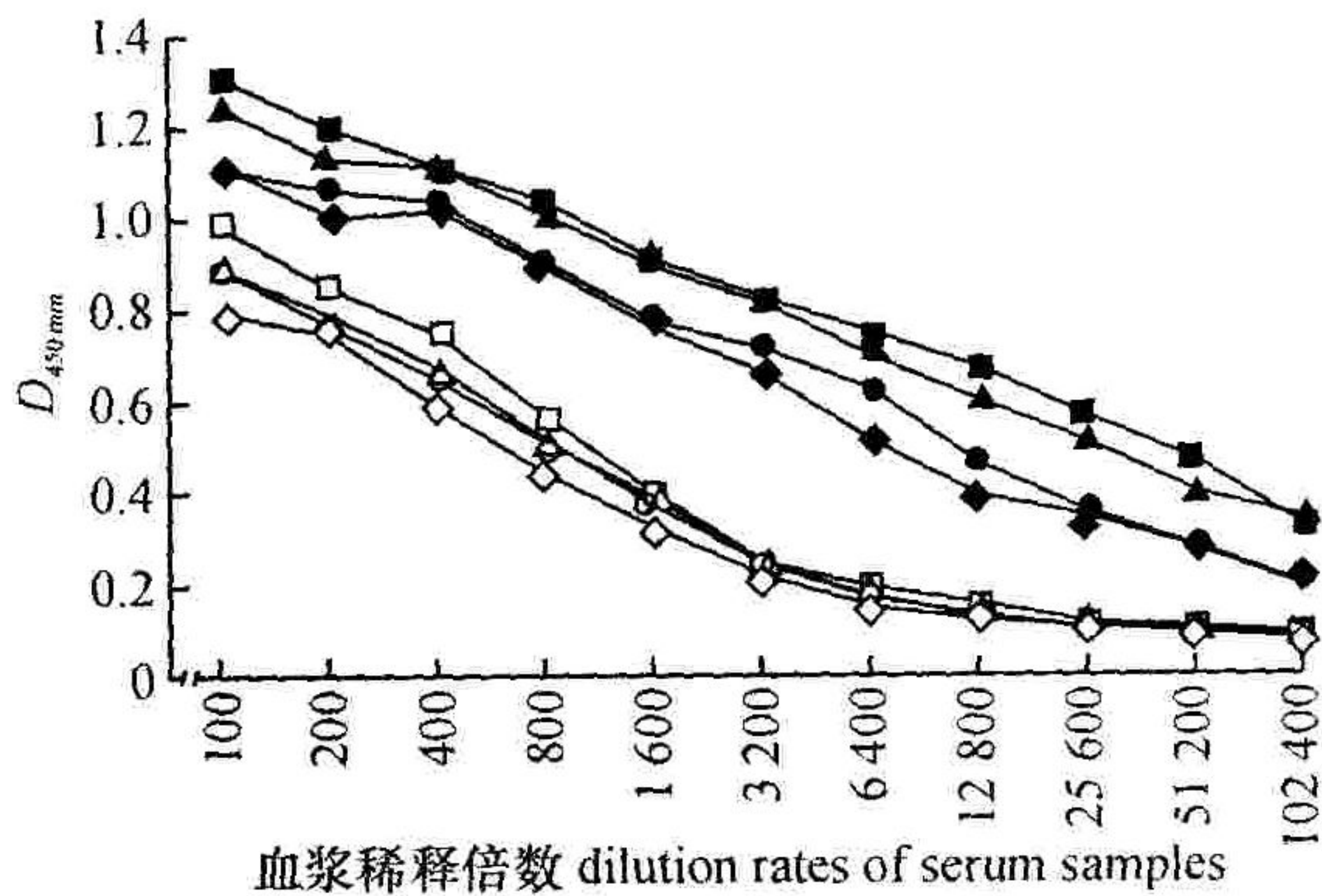
图1 鸡与鹅血浆样品梯度稀释曲线

Fig.1 Curves of chicken and goose serum samples serially diluted

2.2 包被抗原与鹅血浆样品的梯度交叉反应

在4种不同抗原包被浓度条件下(图2),当血样稀释倍数低于6 400倍时,对照组各值均较高,且各曲线斜率随包被浓度的增加而增大;当血样稀释倍数高于6 400倍时,对照组各值均下降并稳定在最低水平($D_{450\text{ nm}} \approx 0.1$);而在整个梯度稀释中,处理组各值均高于对照组值, $D_{450\text{ nm}}$ 随样品稀释倍数的增加而逐步降低,且当血样稀释倍数为12 800倍时,对照组和处理间的 $D_{450\text{ nm}}$ 差距最大.另外,处理组各值在包被质量浓度为150或100 $\mu\text{g/mL}$ 时基本相似,在包被质量浓度为50和25 $\mu\text{g/mL}$ 时也没有太大区别,但是在前2种包被质量浓度下的 $D_{450\text{ nm}}$ 要高于在后2种包被质量浓度下的值.

计算以上结果 P/N 值($P/N = \text{处理组血样 } D_{450\text{ nm}} / \text{对照组血样 } D_{450\text{ nm}}$)(表1).当抗原包被质量浓度为150和100 $\mu\text{g/mL}$ 时, P/N 值总体上高于包被质量浓度为50和25 $\mu\text{g/mL}$ 时的 P/N 值,且前两者的 P/N 值基本相同.同时,当抗原包被质量浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ 时, P/N 值在稀释倍数为12 800倍时最高.



对照组(抗原包被质量浓度):
□150 $\mu\text{g/mL}$, Δ 100 $\mu\text{g/mL}$, $\circ$ 50 $\mu\text{g/mL}$, $\diamond$ 25 $\mu\text{g/mL}$;
处理组(抗原包被质量浓度):
■150 $\mu\text{g/mL}$, $\blacktriangle$ 100 $\mu\text{g/mL}$, $\bullet$ 50 $\mu\text{g/mL}$, $\blacklozenge$ 25 $\mu\text{g/mL}$
BSA-immunized(coating concentration):
□150 $\mu\text{g/mL}$, Δ 100 $\mu\text{g/mL}$, $\circ$ 50 $\mu\text{g/mL}$, $\diamond$ 25 $\mu\text{g/mL}$;
inhibin-immunized(coating concentration):
■150 $\mu\text{g/mL}$, $\blacktriangle$ 100 $\mu\text{g/mL}$, $\bullet$ 50 $\mu\text{g/mL}$, $\blacklozenge$ 25 $\mu\text{g/mL}$.

图2 包被抗原与鹅血浆样品的浓度梯度交叉反应

Fig.2 Crossing-reaction of immunogen to goose serum samples serially diluted

表1 包被抗原与鹅血浆样品浓度梯度交叉反应的 P/N 值

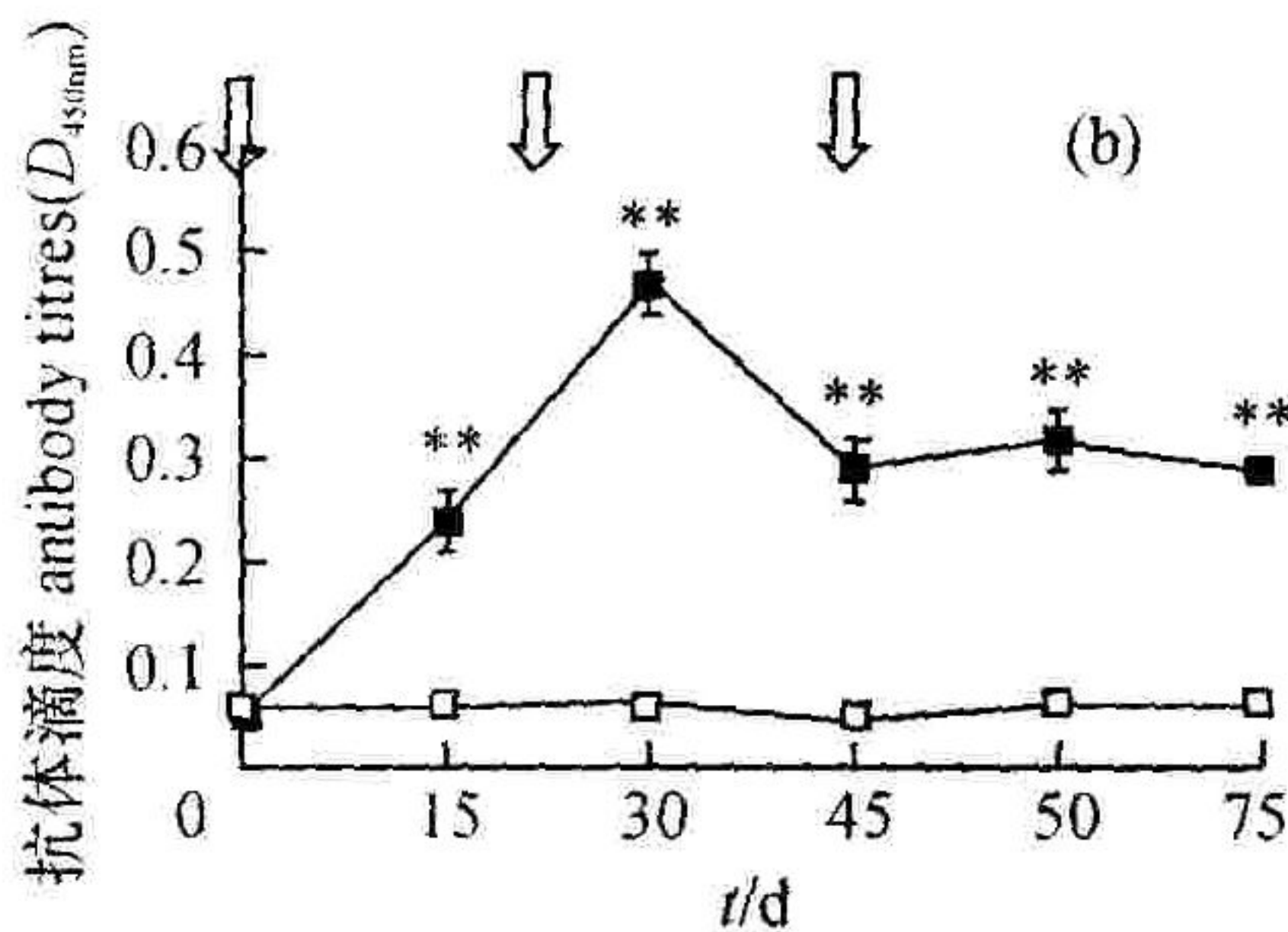
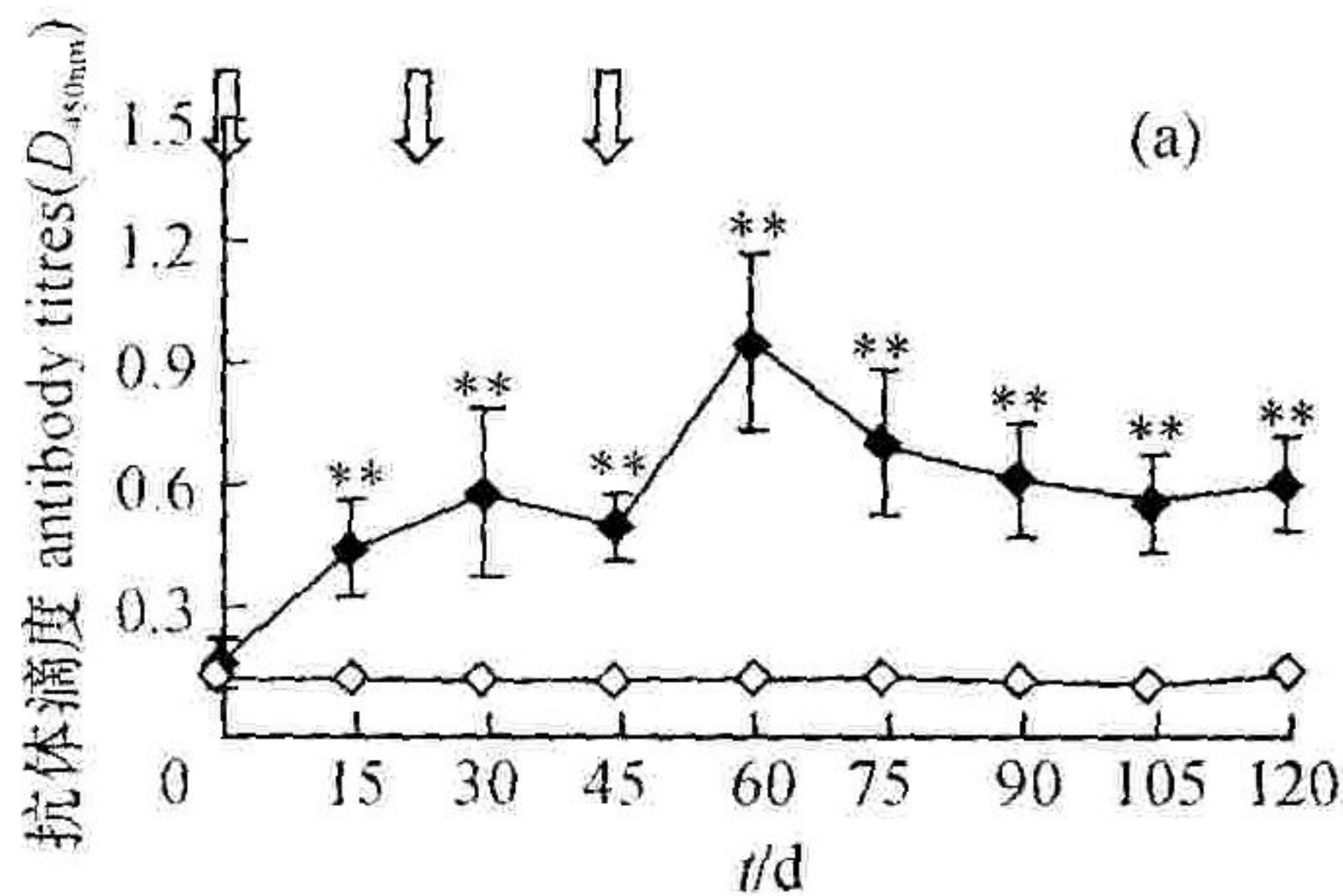
Tab.1 P/N of cross-reaction of immunogen and goose serum samples serially diluted

$\rho(\text{抗原 antigen})$ $/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	血浆梯度稀释倍数 dilution rates of serum samples										
	$\times 100$	$\times 200$	$\times 400$	$\times 800$	$\times 1\ 600$	$\times 3\ 200$	$\times 6\ 400$	$\times 12\ 800$	$\times 25\ 600$	$\times 51\ 200$	$\times 102\ 400$
150	1.330	1.406	1.489	1.832	2.296	3.359	3.752	4.261	4.800	4.198	3.412
100	1.403	1.432	1.658	1.953	2.282	3.157	3.782	4.294	4.283	3.474	3.787
50	1.256	1.379	1.594	1.758	2.094	2.946	3.701	3.467	3.093	2.431	2.101
25	1.397	1.344	1.725	2.011	2.046	3.032	2.948	3.190	3.000	2.602	2.429

2.3 鹅和鸡血液中抗体水平的测定

本方法直接用 $D_{450\text{ nm}}$ 值反映血液中抗体水平(图3).两试验免疫组的抗抑制素抗体水平均在初次免疫和第1次加强免疫后快速上升,只是鹅抗体水平的上升速度比鸡的稍慢,且在第1次加强免疫10 d后有些下降,在鸡上则一直上升到峰值.当再次

加强免疫后,鹅抗体水平重新快速上升,并在再次加强免疫15 d后达到峰值,但维持不久后开始下降,且下降到一定程度后保持稳定;而鸡抗体水平在再次加强免疫前已经开始下降,但在再次加强免疫后停止下降并保持在稳定水平.整个试验阶段2对照组均无抗体产生.



箭头指示免疫时间; * 表示差异显著性(*示 $P < 0.05$; **示 $P < 0.01$);(a) 鹅: $\diamond$ 对照组, $\blacklozenge$ 免疫组;(b) 鸡: $\square$ 对照组, $\blacksquare$ 免疫组
Arrows indicate immunogen inoculations and asterisks indicate significant differences between treatment (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$); (a) goose: $\diamond$ BSA-immunize, $\blacklozenge$ inhibin-immunized; (b) chicken: $\square$ BSA-immunized, $\blacksquare$ inhibin-immunized

图3 鹅和鸡血液中抗抑制素抗体水平的变化

Fig.3 Changes in blood anti-inhibin antibody titres in geese and chickens

3 讨论

在本试验中,用抗鸡抗体替代抗鹅抗体 ELISA 检测鹅血液中的抗体水平,就存在非抗鹅抗体与鹅血液中抗体结合特异性的问题.在相同的反应条件下,均以羊抗鸡抗体作为二抗,ELISA 检测所得鸡与鹅 $D_{450\text{ nm}}$ 的变化呈现相同趋势,均随样品稀释倍数的增加而快速下降,只是后者的下降速度比前者缓,这可能是物种间的差异所致.从鸡与鹅梯度稀释曲线的变化看,当样品稀释倍数较低时,两者反应中的非特异性结合均很高,随着样品稀释倍数的增加,两者都仍存在一定程度的非特异性结合.当样品稀释倍数(6 400 倍以上)足够时,两者的非特异性结合(对照组值)均趋向于 0 ($D_{450\text{ nm}} \approx 0.1$),而此时特异性结合仍很高,甚至鹅的高于鸡.尽管目前对鹅、鸡抗体的差异还不清楚,但这些结果表明,山羊抗鸡抗体与鹅抗体的结合效率与鸡相当,只是结合效率有所差异,这提示鹅抗体分子中存在有与鸡抗体中相同的抗原表位^[3-6].通过包被抗原与血浆样品的梯度交叉反应,当鹅样品稀释为 12 800 倍时,不论抗原包被质量浓度为 150 或 100 $\mu\text{g/mL}$,此时对照组值(阴性值)趋于 0,处理组值(阳性值)与其的差距最大(P/N 值最大).ELISA 中的非特异性结合总是不可避免,但只要反应条件适宜,特别是抗原包被和样品稀释适当,则可将非特异性结合(阴性值)控制在很低水平($D_{450\text{ nm}} \approx 0.1$),以至于与特异性结合(阳性值)相比可忽略不计,因此不论是在鸡上还是在鹅上,当反应条件适宜时,检测所得阳性反应值均可作为反映血液中抗体水平的指标,ELISA 检测整个试验阶段鹅和鸡血浆中的抗体水平,所得结果也均与理论预测值一致,两者呈现类似变化,并且在免疫动物上呈现出的免疫效果与国外类似研究相同^[7-12].这些结果说明,ELISA 检测鹅血液中抗体水平的试验,可用抗鸡抗体代替抗鹅抗体作为二抗.

除以上因素外,影响 ELISA 敏感性和特异性的因素还很多,抗原纯度就是其中重要因素之一^[13].当所用抗原为粗制品或部分提纯品时,会造成非特异性背景加深,影响结果的准确性^[14].由于本试验所用包被抗原和免疫抗原为同一蛋白,是通过基因工程技术构建和表达纯化的抑制素重组蛋白,纯度高达 95% 以上^[2,15],因此对本试验结果没有太大影响.

参考文献:

- [1] 杨利国,胡少昶,魏平华,等.酶免疫测定技术[M].南京:南京大学出版社,1998.
- [2] 于迎春,施振旦,刘颖,等.免疫抑制素提高粤黄鸡产蛋性能的研究[J].农业生物技术学报,2006,14(1): 27-32.
- [3] 王细文,梁平,韩本立.应用噬菌体随机肽库研究蛋白质抗原表位的进展[J].免疫学杂志,2000,16(4): 313-314.
- [4] 柯岫,戚中田,施明,等.从噬菌体随机肽库筛选庚型肝炎病毒 E2 抗原表位[J].第二军医大学学报,2000,21(9): 838-841.
- [5] 朱勇,金伯泉,刘雪松.用生物传感器测定重组人 $\alpha 2\text{a}$ -干扰素单克隆抗体的亲和力及抗原识别表位[J].中国免疫学杂志,2000,16(6): 322-328.
- [6] 傅涛.噬菌体展示技术在病毒抗原表位筛选中的应用[J].国外医学:病毒学分册,2004,11(5): 145-148.
- [7] HUANG Y M, SHI Z D, LI M Y, et al. Effects of immunization against inhibin on egg laying performance in Magang and Landaise geese [C]//World's poultry science association. Proceedings of the 3rd World Waterfowl Conference, Guangzhou. Guangzhou:[s. n.],2005:123-131.
- [8] AHN J, YOU S, KIM H, et al. Effective of active immunization with inhibin alpha subunit on reproductive characteristics of turkey hens [J]. Biology of Reproduction, 2001, 65(5): 1594-1600.
- [9] BLEACH E C L, MUTTUKERSHNA S, CUNNINGHAM F J, et al. Effect of inhibin immunization using different synthetic peptide fragments of the bovine α -subunit on plasma anti-inhibin titres, plasma FSH concentrations and the incidence of multiple ovulation in heifers [J]. Animal Reproduction Science, 1996, 41(1): 1-12.
- [10] MCKEOWN R M, CALLAGHAN D O, ROCHE J F, et al. Effect of immunization of rams against bovine inhibin $\alpha 1-26$ on semen characteristics, scrotal size, FSH, LH and testosterone concentrations [J]. Journal of Reproduction and Fertility, 1997, 109(2): 237-245.
- [11] MOREAU J D, SATTERLEE D G, REJMAN J J, et al. Active immunization of Japanese Quail hens with a recombinant chicken inhibin fusion protein enhances production performance [J]. Poultry Science, 1998, 77(6): 894-901.
- [12] SATTERLEE D G, CADD G G, FIORETTI W C. Active immunization of broiler breeder hens with a recombinant chicken inhibin fusion protein enhances egg lay [J]. Poultry Science, 2002, 81(4): 519-528.
- [13] 程安春,汪铭书,廖德惠,等.酶联免疫吸附试验检测鸭瘟抗体的研究和应用[J].四川农业大学学报,1997,15(3): 379-384.
- [14] 袁明龙,杨永纪,诸奎龙.鸭瘟抗体检测方法研究[J].中国预防兽医学报,2001,23(2): 140-143.
- [15] 于迎春.免疫重组鸡催乳素和抑制素融合蛋白对鸡繁殖表现的影响[D].广州:华南农业大学动物科学学院,2004.

【责任编辑 柴 焰】