

H-Y 抗血清的制备、检测与应用*

蔡耀垣¹ 罗承浩² 高向阳¹

(1 华南农业大学生物学, 2 华南农业大学动物科学系, 510642, 广州)

摘要 用纯系(BALB/c)雄性小鼠制备 H-Y 抗原对雌性大鼠进行免疫,可获得特异性的 H-Y 抗体。经初步检测, H-Y 抗血清的效价为 1:32。用 ELISA 检测结果为阳性反应, 抗血清与鼠精子有特异性抑制的凝集作用, 凝集反应的程度随抗血清的稀释而降低, 对牛的 Y 精子也有特异性抑制, 经抗血清感作过的牛精子荧光反应消失。曾两次用 H-Y 抗血清感作过的牛精液对母牛进行体外输精, 试验结果雌性比率分别达到 81.80% 和 80%。

关键词 免疫; H-Y 抗血清; 荧光反应; 凝集反应; 酶联免疫吸附法

中图分类号 S852.43

对家畜后代性别的控制, 长期以来是人们的预望。Wachfel(1975) 发现染色体编码的细胞膜 H-Y 抗原, 能直接或间接地诱导原始性腺分为睾丸, 这一事实说明 H-Y 抗原在性腺分化具有重要的意义。本项试验研究是用常规免疫的原理和方法制备 H-Y 抗血清, 并用免疫检测技术对这种抗血清的特异性进行检测及应用用于母牛体外受精, 以提高母牛生育的雌性率。

1 材料与方 法

1.1 材 料

小鼠、大鼠(BALB/C)来自中山医科大学实验动物饲养场。

牛精液 华南农业大学乳牛场

荧光素 广州化学试剂厂

辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase)

1.2 方 法

1.2.1 免疫 用小鼠睾丸制得的匀浆液, 经初步纯化后直接对雌鼠进行多途径免疫。在第 1 次免疫原中加入 Freund 完全佐剂, 加强免疫不加入佐剂, 经 5 次加强免疫后隔 1 周采血。

1.2.2 效价测定 用环状沉淀法和平板直接凝集反应。

1.2.3 ELISA 检测 用抗体夹心法, HRP 标记抗体, 用戊二醛法标记, 酶底物溶液用联苯胺及过氧化氢。

1.2.4 荧光素染色标记 (1)用荧光素染色标记牛 X 与 Y 染色体精子观察 F 小体的特异性荧光反应。(2)用 H-Y 抗血清结合定量的补体感作牛精子后再用荧光素染色标记和观察 F 小体的特异性荧光反应。通过以上对照试验, 借以检测 H-Y 抗体的生物活性。

1.2.5 直接凝集试验 用不同稀释度的抗血清与鼠精子直接作用, 观察其发生凝集反应的程度, 检测抗血清的专一性和生物效价。

1993-08-26 收稿

*本课题为广东省科委“八五”农科重点攻关项目

2 结果

2.1 试管环状沉淀反应: 用 0.2 mL 抗血清按 2 的等比级数连续稀释, 然后分别加入 0.2 mL 抗原与之反应, 结果如表 1 所示。

表 1 不同稀释度抗血清与抗原反应结果

抗血清稀释度	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
反应血清	++++	+++	++	+	±	-
对照血清	+	±	-	-	-	-

由表 1 表明, 抗血清稀释至 1:32 时还能见到有沉淀反应, 对照血清与抗原没有特异性反应, 环状沉淀不明显。

2.2 酶联免疫吸附检测结果列于表 2。

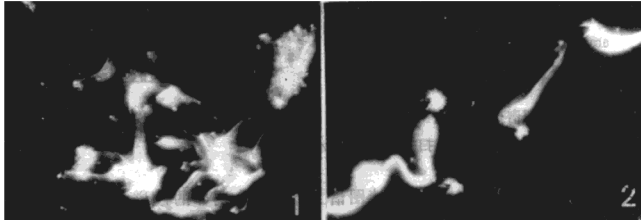
表 2 酶联免疫吸附检测结果⁽¹⁾

样品	组号	结果 (OD ₄₉₂)			平均
对照血清		0	0	0	0
	1	0.004	0.004	0.004	0.004
抗血清	2	0.003	0.007	0.005	0.005
	3	0.019	0.021	—	0.020
	4	0.019	0.019	—	0.019

(1) 用上海第三分析仪器厂出产的 721B 型分光光度计检测

本试验为 2 批不同的抗血清, 第 1,2 组为一批, 第 3,4 组为一批, 2 批结果有差异, 说明抗血清的效价还不够稳定, 但 2 批结果都为阳性反应。

2.3 用荧光素对牛精子染色标记结果表明, 0.1% 浓度的荧光素对牛精子染色 30 min 的结果良好, 可见到部分精子的头部有明显的特异性荧光亮点(见图版 1), 用 H-Y 抗血清感作牛精液后, 10 min 后仍可见到少量荧光亮点, 20 min 后则荧光亮点全部消失(见图版 2)。说明本试验所制备的 H-Y 抗血清对牛 Y 精子有特异性的抑制作用。



图版 1 荧光素对牛精液染色, 精子头部呈现明显的荧光亮点;

2 被 H-Y 抗血清感作后的牛精液, 用荧光染色, 未见明显的荧光亮点。

2.4 直接凝集反应, 用不同稀释度抗血清对鼠精子直接作用, 结果见表3。

表3 不同稀释度抗血清对鼠精子凝集效果比较

鼠精子/mL ⁽¹⁾	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
抗血清稀释度	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
凝集反应结果	++++	++++	+++	++	+	±	-

(1) 每毫升含鼠精子 10⁶ 个。

从表3可见, 抗血清对鼠精子有特异性的凝集反应, 凝集反应的程度随抗血清的稀释而降低, 这一结果进一步表明抗血清的生物效价为1:32。

用0.2 mL正常血清与0.2 mL鼠精子反应30 min后, 虽还能见到凝集反应, 但随着血清浓度的降低, 基本上未见有凝集反应。

2.5 用盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳分离抗血清蛋白质, 与正常血清比较, 结果如图1,2所示。

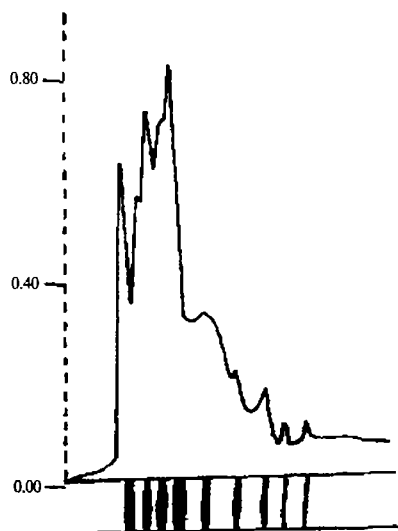
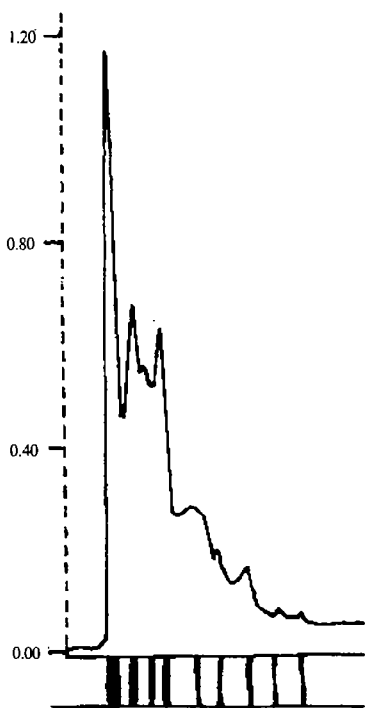


图1 抗血清电泳图谱扫描*

图2 正常血清电泳图谱扫描*

* 用岛津CS-930双波长扫描仪(Shimadzu)

从扫描显示的波谱图来看, 抗血清图谱上出现一个明显的波谱, 其它蛋白质带显示的波峰与正常血清也有明显的差别, 这一结果可以认为, 峰值最高的蛋白带是由H-Y抗原刺激免疫细胞所产生的免疫球蛋白(IgG)。

2.6 应用效果, 试验是在华南农业大学乳牛场进行。选择发情母牛用 H-Y 抗血清感作过的牛精液进行输精, 2 批试验结果列于表 4 和表 5。

表 4 H-Y 抗血清 - 牛精液输精的作用效果⁽¹⁾(1991) %

组别	试验头数/头	精液种类	妊娠		产 犊			
			头数/头	百分率	公/头	百分率	母/头 百分率	
试验	24	H-Y 抗血清 - 牛精液	10	41.3	2	18.2	9	81.80
对照	41	正常精液	20	48.7	11	52.3	10	47.7

(1) 其中一胎产异性双犊

表 5 H-Y 抗血清 - 牛精液输精的作用效果(1992) %

组别	试验头数/头	精液种类	妊娠		产 犊			
			头数/头	百分率	公/头	百分率	母/头 百分率	
试验	11	H-Y 抗血清 - 牛精液	5	45.4	1	20	4	80
对照	27	正常精液	13	48.1	7	53.8	6	46.2

由表 4 和表 5 可见, H-Y 抗血清 - 牛精液进行输精, 对提高雌性比率有显著的效果, 1991 年和 1992 年试验结果, 雌性率分别达到 81.80% 和 80%。

3 讨论

H-Y 抗原是组织相容性抗原 Y(histocompatibility antigen Y), 在哺乳动物中, 是雄性特有的细胞表面蛋白质, 它是 Y 染色体上的基因编码, H-Y 抗原的结构基因与睾丸分化的启动密切相关, 睾丸细胞一旦形成, 便可分泌睾丸激素阻止性腺发展为雌性表现型的趋势(王梦玖等, 1985; 林剑等, 1987)。因此利用雄性动物的 H-Y 抗原对雌性动物免疫, 可刺激雌性动物 B 细胞产生对 H-Y 抗原具有特异性反应的 H-Y 抗体, 这种 H-Y 抗体能阻遏 Y 染色体精子的基因表达, 抑制 Y 染色体精子细胞膜上 H-Y 抗原的产生(王梦玖等, 1985; Tizard 1987)。根据这一理论, 本试验应用常规免疫的原理和方法制备得 H-Y 抗血清, 经初步检测, H-Y 抗血清具有较好的生物活性, 应用此 H-Y 抗血清抑制牛 Y 染色体精子的受精能力而提高牛的雌性比率。

由于 H-Y 抗原是一弱的组织相容性抗原, 而且是成分复杂的粗抗原, 它既包含 H-Y 抗原, 也包含其它蛋白成分, 因此, 对 H-Y 抗原专一性的 r- 球蛋白(IgG)和正常的 IgG 或其它抗原的 IgG 往往会混合存在于免疫动物的血清中, 这就给 H-Y 抗体的分离纯化与检测工作带来许多困难。本研究采用几种方法检测 H-Y 抗体的活性初步获得较好的结果, 用盘状聚丙烯酰胺凝胶电泳(张龙翔等, 1985)分离抗血清蛋白质与正常血清相比较, 免疫血清的扫描图谱出现一个明显的波峰, 其峰值接近 1.200, 而正常血清在相同位置上显示的波峰其 OD 值却在 0.600 ~ 0.700 之间, 其它蛋白显示的波峰亦有明显的不同。这一结果可以认为峰值最高的蛋白质是由于 H-Y 抗原刺激免疫细胞产生的 IgG

用不同稀释度的抗血清与鼠精子直接起凝集反应(徐宜为, 1991), 凝集反应程度随抗血清的稀释而降低。而正常血清用最高浓度与鼠精子虽也能见到微弱的凝集反应, 但一旦稀释, 凝集反应未见发生, 这一结果可进一步表明, 抗血清对来自鼠细胞的 H-Y 抗原是有专一性。抗血清的效价达到 1:32。用荧光素标记牛 Y 染色体精子, F 小体呈现特异性荧光反应, 用 H-Y 抗

血清处理后, 荧光反应立即消失(罗承浩等, 1992), 这个结果又一次表明本试验制备的 H-Y 抗血清对牛 Y 染色体精子同样具有抑制作用。

本试验所取得的结果仅是初步探索, 在提高抗原的纯度、抗原的生化性质以及测定方法的建立等方面, 尚在继续探索, 但可以相信, 通过免疫的途径控制家畜的性别分化, 是具有发展前途的途径之一, 它为控制家畜性别提供一种直接安全而有效的简便方法, 是家畜繁殖生物技术应用研究中一项重大的研究课题, 具有重要的生物科学理论价值和经济价值。

致谢 文中电泳图谱承华南农业大学生物系邓兆活副教授帮助扫描, 照片承刘治纬高级工程师拍摄, 谨此致谢。

参 考 文 献

- 王梦玖, 腾春英. 1985. 产科免疫. 长春: 吉林科学技术出版社, 408 ~ 414
- 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 1985. 生化实验方法和技术. 第4版. 北京: 高等教育出版社, 94 ~ 111
- 林 剑. 1987. 免疫遗传学基础. 北京: 北京大学出版社, 383 ~ 396
- 罗承浩, 蔡耀垣, 丘 陵, 等. 1992. 精子性别化对乳牛性别控制的试验. 华南农业大学学报, 13(4): 142 ~ 145
- 徐宜为. 1991. 免疫检测技术. 第2版. 北京: 科学出版社, 45 ~ 90
- Tizrad L. 1987. Veterinary Immunology and Introduction. 3rd. Texas: W B Saunder Co, 171 ~ 181
- Wachtel S S, Ohno S, Koo G C, et al. 1975. Possible role for H-Y antigen in the Primary determination of sex. Nature, 257: 235 ~ 236

PREPARATION ASSAY AND UTILIZATION OF H-Y ANTISERUM

Cai Yaoyuan¹ Luo Chenghao² Gao Xiangyang¹

(1 Dept. of Biology, 2 Dept. of Animal Sci., South China Agr. Univ., 510642, Guangzhou)

Abstract H-Y antigen was isolated from inbred mice and subsequently used to immunize female rats for preparing H-Y antiserum. The antiserum attained a titre of 1 : 32 as indicated by a positive ELISA reaction. Specific inhibitor agglutination of mice spermatozoa by H-Y antiserum occurred, which diminished upon dilution of the H-Y antiserum. Results also indicated that if bovine semen was treated with H-Y Antiserum, the characteristic fluorescent reaction of the semen would disappear. There was also evidence that using H-Y antiserum showed marked specific inhibition on Y-bearing sperms. A ratio of more than 80% female progeny in cows was successfully reached twice after artificial insemination with bovine semen pretreated with H-Y antiserum.

Key words Immunization; H-Y antiserum; ELISA; Agglutination reaction Fluorescence reaction