

赵万乐,张兆旺. 鸡抗奶牛 Y 精子蛋黄抗体的制备[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):161-163.

鸡抗奶牛 Y 精子蛋黄抗体的制备

赵万乐, 张兆旺

(甘肃农业大学动物科学技术学院,甘肃兰州 730070)

摘要:用洗涤后的奶牛 Y 精子与免疫佐剂 1:1 混合,免疫产蛋母鸡,收集免疫蛋,用水稀释法进行卵黄抗体(YAb)的分离,对提取的 YAb 用奶牛 Y 精子进行滴度测定,并对提取样品进行抗体含量、得率以及提取前后抗体效价损耗率进行测定。结果表明:卵黄中含有与奶牛 Y 精子作用的有效抗体(IgY),并且能使精子发生凝集现象;水稀释法提取后抗体得率为 88.38%,抗体效价损耗率为 12.49%。该抗体对 Y 精子作用的专一性有待进一步研究。

关键词:奶牛 Y 精子;卵黄抗体

中图分类号: S852.4⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0161-02

卵黄免疫球蛋白(egg yolk immunoglobulin, IgY)也称卵黄抗体,是母鸡在卵的发育过程中由血清中的 IgG 有效转移至卵黄而成^[1]。卵黄抗体具有产量高、成本低、易于生产、不需放血即可大量获得的优点,因此它在疾病诊断、防治等诸多方面得到了广泛应用^[2]。精子具有免疫原性质的发现,使人们能够用精子制成抗原去免疫机体,使其产生相应的抗体,从而达到避孕等目的。本试验以分离的奶牛 Y 精子作为免疫抗原,免疫产蛋母鸡,从蛋黄中提取特异的抗奶牛 Y 精子的抗体,并用这些抗体作用于奶牛的精子,期望能达到分离 X、Y 精子的效果。

1 材料与方法

1.1 供试产蛋鸡

选用 30 周龄的海兰母鸡作为供试鸡群。饲养于甘肃农业大学实验动物中心鸡舍。采用三阶笼养,整个试验期内自由采食和饮水。

1.2 精子样品

本试验所用奶牛 Y 精子样品均为购自大连金弘基种畜有限公司生产分离的奶牛 Y 精子。

1.3 精子免疫原的制备

液化后的奶牛精液用稀释液(配方:葡萄糖 5 g、乙二胺四乙酸二钠 0.1 g、柠檬酸钠 0.3 g、蒸馏水 100 mL)稀释,2 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。用稀释液压集精子,2 000 r/min 离心 10 min,如此洗涤 4 次至上清无蛋白。用稀释液校正精子密度为 400×10^8 /L。

1.4 免疫

取试验用母鸡 5 只,胸肌 5 点注射与完全佐剂 1:1 混合的精子抗原进行初免。初免后的第 2、4、6 周各加强免疫

1 次,之后每隔 1 个月加强免疫 1 次。加强免疫用不完全佐剂。初免 5~7 d 后开始收集免疫蛋。

1.5 卵黄抗体的提取

参考文献[3]并加以改进,采用水稀释法对抗体进行初提。卵黄中以 1:6 比例加入纯化水,搅拌均匀,用盐酸调 pH 值为 5.0~5.2,4℃静置 5 h,然后 4℃、10 000 r/min 离心 25 min,弃掉沉淀,收集上清液,再添加 19% 硫酸钠沉淀,在 45℃水浴中温浴 5 min,等沉淀溶解后用乙醇沉淀,静置过夜取上清液,量取容量。

1.6 精子凝集试验及抗体效价评定

参考文献[4],取小试管 8 支,分别标明 1~8 号,每管各加生理盐水 100 μL,取所保存的液体样品 100 μL 加入到第 1 管充分混匀后,从第 1 管取 100 μL 加入到第 2 管,充分混匀后取 100 μL 加入到第 3 管,依次倍量稀释。将第 8 管的 100 μL 稀释液弃去,然后向各管中加入奶牛 Y 精子样品 100 μL,充分混匀,显微镜下检测。

1.7 IgY 含量及回收率的测定

参考文献[5],采用紫外分光光度法,以生理盐水为对照,分别测定 260 nm 和 280 nm 处的光吸收值,根据公式:

$$\text{IgY 浓度}(\text{mg/mL}) = 1.50D_{280\text{ nm}} - 0.75D_{260\text{ nm}}$$

计算出原卵黄中和样品中的 IgY 含量,并计算得率。

1.8 蛋黄液提取前后抗体总量及抗体损耗率计算

参照文献[3],将提取的 YAb 溶液测得的抗体效价分别乘以所提取的总量,得到提取后的抗体总量,再用提取前的抗体总量减去提取后的抗体总量,得到的结果即为提纯过程的损耗量。

1.9 保存期测定

抗体放置冰箱(4~8℃)保存 8 个月,观察其物理性状,并接种肉汤培养基作无菌检查。

2 结果

2.1 抗体对精子的凝集情况

由图 1 至图 3 可以看出,在不加入 IgY 时,精子较分散,没有发生精子凝集现象(图 1);当加入未免疫母鸡蛋黄中提取的 IgY 后,精子也不发生凝集(图 2);当加入从免疫母鸡蛋黄中提取的 IgY 后,精子密度明显增大,精子发生较明显的凝

收稿日期:2012-11-29

基金项目:甘肃省农牧厅生物技术研究与应用项目(编号:GNSW-2009-05)。

作者简介:赵万乐(1987—),男,山西晋城人,硕士研究生,研究方向为动物繁殖。E-mail:503587578@qq.com。

通信作者:张兆旺,博士,教授,研究方向为动物繁殖。E-mail:zhangzhaowang@gsau.edu.cn。

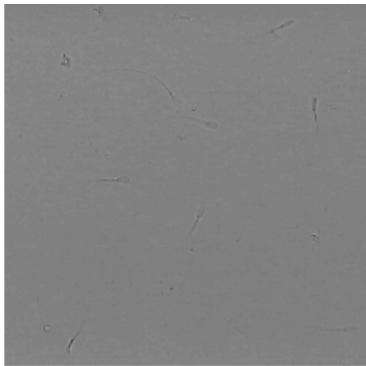


图1 不加IgY的精子凝集情况

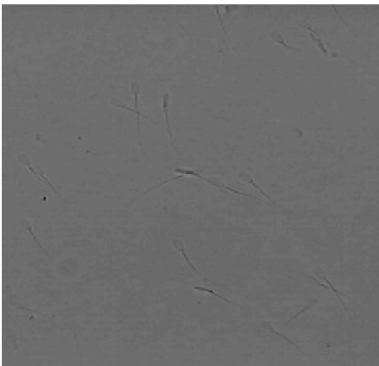


图3 加入免疫后母鸡蛋黄IgY的精子凝集情况

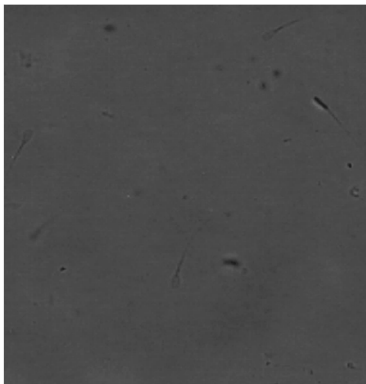


图2 加入未经免疫母鸡蛋黄中的IgY的精子凝集情况

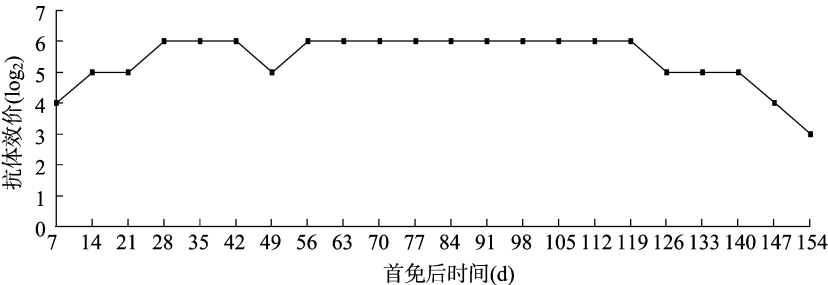


图4 抗体滴度随时间的变化关系

2.3 IgY 含量、得率及抗体损耗、损耗率测定结果

由表 1 可见,水稀释法提取后抗体得率为 88.38%,抗体效价损耗率为 12.49%。

表 1 IgY 含量、得率及抗体损耗测定结果

样品	IgY		IgY 效价		
	含量 (mg)	得率 (%)	效价	抗体损耗	损耗率 (%)
原卵黄	114.896	88.38	85.332	10.658	12.49
水稀释法 提取后样品	101.476		74.674		

注:表中数值均为多次测定后的平均值。

2.4 保存期

将提取的 YAb 放置冰箱(4~8℃)保存 8 个月后,其物理性质仍保持不变;接种肉汤培养基作无菌检查,均无菌。

3 讨论

家禽受到外源抗原的刺激后,外源抗原能够刺激 B 淋巴

集现象(图 3)。

2.2 抗体滴度随免疫时间的变化关系

以首免后时间为横坐标,以所测抗体效价的 log₂ 的值为纵坐标,抗体效价与时间变化关系如图 4 所示。

从图 4 可以看出:第 1 次免疫后 1 周,产生特异性抗体;第 2 次免疫后,抗体滴度增加;第 3 次免疫后,抗体滴度继续增加,并达到最高峰;第 4 次免疫后,抗体滴度继续维持在最高峰,其间有 1 个小小的回落,但马上又达到最高;第 5 次免疫后 2 个月,抗体滴度一直维持在最高;从第 5 次免疫后的 3 个月开始,抗体滴度逐渐下降。

细胞分化形成浆细胞,然后分泌特异性的抗体进入机体的血液循环。由于卵黄膜的表面有密集的免疫球蛋白受体,所以当血液流经卵巢时,血液中的特异性抗体(主要是 IgY)会与卵黄膜上的受体结合,并通过主动运输被从血液中大量转移到卵黄中,并在卵黄中富集,形成卵黄抗体^[6]。精子具有免疫原性,某些特异性抗体与精子抗原结合后可影响精子的运动或获能,干扰精卵结合从而引起不育^[7]。

本试验中,当用洗涤后的奶牛 Y 精子混合免疫佐剂去免疫产蛋母鸡时,会产生大量的特异的抗 Y 精子抗体并在卵黄处富集。将特异抗体与 Y 精子混合后产生免疫反应,从而影响 Y 精子的运动,使得 Y 精子产生凝集现象。在整个免疫过程中,开始阶段,随着免疫次数的增加,抗体滴度逐渐上升,但当第 5 次免疫后停止免疫,从停止免疫后的 3 个月开始,抗体滴度逐渐下降,可能的原因是机体逐渐适应了免疫抗原,机体对抗原的排异性减弱,抗体产生也逐渐减少,也可能是机体内的抗原量逐渐减少,对机体的刺激也逐渐减小,所以抗体产生也逐渐减少。

宋德荣,王嘉福,周大荣,等. 贵州黑马羊新品种培育[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):163-165.

贵州黑马羊新品种培育

宋德荣^{1,2}, 王嘉福¹, 周大荣², 彭 华², 杨思维², 江兴美², 吴蕊汝²

(1. 贵州大学动物科学学院, 贵州花溪 550025; 2. 贵州省毕节市畜牧兽医科学研究所, 贵州毕节 551700)

摘要:为培育贵州黑马羊新品种,采取在农家建立核心群的开放式选育方法,制定综合选择指数和建立 BLUP 模型估测育种值,指导选种选配及选育提高。结果表明:核心群周岁公羊、母羊体重分别达 (29.77 ± 5.51) 、 (25.18 ± 5.67) kg,成年公羊、母羊体重分别达 (40.08 ± 7.73) 、 (34.90 ± 6.56) kg;基础群周岁公羊、母羊体重分别达 (26.59 ± 3.68) kg、 (24.09 ± 4.60) kg,成年公羊、母羊体重分别达 (35.33 ± 4.09) 、 (32.16 ± 6.83) kg;产羔率达 152.33%;屠宰率达 48.50%,净肉率为 38.94%。贵州黑马羊新品种生产性能、品种整齐度明显提高,遗传性能稳定。

关键词:山羊;黑马羊;生产性能;品种特征;培育

中图分类号: S827.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0163-03

贵州黑马羊是从贵州黑山羊中分化出来的一群无角个体,生活在毕节高寒山区,产区地形破碎,山高坡陡,切割纵深,海拔多在 1 400~2 000 m 之间,相对湿度 80% 左右,年均气温 10.5~13.4℃,无霜期 209~245 d,降水量 800 mm,属湿润气候暖温带地区。产区草山草坡、灌木草从资源丰富,多为传统放牧,管理简单。黑马羊具有耐粗饲、抗寒耐湿、早熟易肥、皮薄骨细、肉质优美等特点,已显示出优良的种质特性^[1],但总体生产性能、品种整齐度还有待提高,因此特开展品系选育,以期培育出体格大、产肉多、净肉率高、繁殖性能

好、外貌特征独特的优良肉用新品种。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以 2006 年贵州省赫章县古达、威奢、兴发等选育基地的贵州黑马羊为试验材料。

1.2 试验方法

1.2.1 品种整齐度选育 统一外貌特征,把被毛黑色、头无角、颌下有髯、颌下有肉垂等质量性状作为贵州黑马羊的外貌特征进行选育。

1.2.2 生产性能选育 主要采取把核心群建立在农户中的核心群开放式选育方法,选育提高黑马羊生长速度和繁殖性能。首先组建核心群,开展闭锁繁育,培育后备种公羊推广到基础群中去配种,然后再从基础群中选育优良种公羊吸收到核心群中来,保证基因的双向流动,以加快选育进展。

种公羊选择:先根据制订的生产性能选育指标,把体格大、生长速度快、背腰平直、前胸开阔、雄性十足、体型外貌好的优秀公羊初选为配种公羊,再采用 BLUP 法估测种公羊育种值,最后根据系谱和后裔鉴定成绩综合评定。

种母羊选择:先根据制订的生产性能选育指标,把繁殖性能好、母性强、体型外貌好的优秀母羊初选为配种母羊,再利

收稿日期:2012-12-05

基金项目:国家农业科技成果转化资金(编号:2012GB2F200408);贵州省农业科技攻关计划(编号:黔科合 NY 字[2011]3064 号);贵州省高层次人才科研条件特助经费项目(编号:TZJF-2010 年-034 号);贵州省农业动植物育种专项(编号:黔农育专字[2009]019 号);贵州省毕节市农业科技攻关(编号:毕科合字[2012]23 号);贵州省科技厅、毕节市政府、中国科学院昆明分院科技合作项目(编号:省地院合 2010-05)。

作者简介:宋德荣(1967—),男,贵州大方人,硕士,研究员,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail:sdr0857@126.com。

通信作者:王嘉福,博士,教授,主要从事动物基因工程研究。E-mail:jfwang@gzu.edu.cn。

4 小结

用奶牛 Y 精子免疫产蛋母鸡,在鸡蛋蛋黄中会产生能与精子发生免疫反应的蛋黄抗体(IgY),使精子产生凝集现象。这种技术可能会在今后利用于奶牛的性别控制等方面的研究中利用。在 5 次免疫后停止免疫,抗体滴度能维持较高的水平达 2 个月,从第 3 个月开始滴度逐渐降低,所以在生产实践中要及时地对机体进行加强免疫。

参考文献:

[1] Morrison S L, Mohammed M, Wims L A, et al. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk[J]. Mol Immunol, 2002, 38(8): 619-625.

[2] 那 红, 杨曜中, 袁勤生. 鸡卵黄免疫球蛋白的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 1997, 18(3): 151-155.

[3] 苏伟桐, 刘镇明. 蛋黄抗体三种提取方法的比较[J]. 中国兽医杂志, 2009, 43(4): 38-41.

[4] 吕年青, 黄宇烽, 赵金然, 等. 鸡抗人精子卵黄抗体 IgY 的制备[J]. 中华男科学, 2000, 6(2): 111-113.

[5] 黄青松, 罗深秋, 林元藻, 等. 抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)卵黄免疫球蛋白(IgY)的制备与性质研究[J]. 广东药学院学报, 2008, 24(2): 182-184.

[6] 史同瑞, 黄宇翔, 苏永福. 卵黄免疫球蛋白的性质与特点[J]. 动物医学进展, 2010, 31(2): 114-117.

[7] Chamley L W, Clarke G N. Antisperm antibodies and conception[J]. Semin Immunopathol, 2007, 29(2): 169-184.