

徐志伟, 刘 泉, 时小艳, 等. 利用湖羊生产人 ApoB 多抗血清免疫新方法[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(3): 186–187.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.059

# 利用湖羊生产人 ApoB 多抗血清免疫新方法

徐志伟<sup>1</sup>, 刘 泉<sup>1</sup>, 时小艳<sup>2</sup>, 花卫华<sup>1</sup>, 徐小波<sup>3</sup>, 于建宁<sup>3</sup>

(1. 江苏丘陵地区镇江农业科学研究所, 江苏句容 212400; 2. 江苏食品职业技术学院医药与健康管理系, 江苏淮安 223003;  
3. 江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏南京 210014)

**摘要:**利用湖羊生产羊抗人 ApoB, 将人 ApoB 免疫原经湖羊皮下与皮内及淋巴结多点接种并进行多次加强免疫, 建立利用湖羊生产人 ApoB 多抗血清免疫的新方法, 获得高效价抗人 ApoB 抗体, 并且采用琼脂扩散方法检测抗体效价。结果显示, 5 次免疫后的羊抗人 ApoB 多抗血清效价达  $2^{10}$  以上, 试验结果达到预期, 湖羊采用合适的免疫程序完全可以生产抗血清, 经济效益可观。

**关键词:**湖羊; 人 ApoB; 抗血清; 琼脂扩散法

**中图分类号:** S852.5      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2015)03-0186-02

传统的畜禽养殖业利润较少, 且受市场行情及疾病影响较大, 抵御市场风险能力差, 亟需转变传统养殖观念, 提高养殖经济效益。将生物技术引入畜禽养殖业, 以畜禽为载体, 为人类生产各类生物制品(特定蛋白、特异性抗体、特殊材料等), 既可以解决传统养殖利润低的问题, 又可以为人类提供高品质蛋白, 降低医疗成本。以羊生产羊抗人的抗体计算, 1 只羊利润约 1 万元, 大大高于传统养羊的利润。载脂蛋白 B (ApoB) 被认为是包含载脂蛋白的脂蛋白的显著标记, ApoB 是脂蛋白结构的限制因素<sup>[1]</sup>。研究表明, 人 ApoB 对于糖尿病、急性冠状动脉综合征等心血管疾病的诊断及后期临床治

疗具有重要意义<sup>[2]</sup>。目前通过免疫羊获得羊抗人抗体的效价不高, 如何提高抗体效价是利用羊生产人抗体的主要限制因素之一。本研究利用湖羊制备人 ApoB 多抗血清, 对原有的常规免疫程序加以改进, 建立一套从湖羊免疫、血清采集到抗体效价检测的生产方法, 旨在为增加养殖业附加值、提高养殖户收入提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

选用体质量约 35 kg 的健康青年湖羊 25 只, 免疫前全部打上耳标, 采用群养放牧饲养方式, 白天放牧 4 h, 上午、下午各 2 h, 晚上添加少量精料, 有利于羊身体健壮, 避免过肥, 自动饮水, 每天早晚各观察 1 次羊的健康状况。

### 1.2 抗原

人 ApoB 抗原自行制备, 纯度高于 98.5%, 接种前 0.1 mL 抗原(含 1 mg 抗原) + 1.9 mL 无菌 PBS + 2 mL 弗氏完全(或不完全)佐剂充分混合, 制成 4 mL 免疫原乳剂备用。

收稿日期: 2014-09-16

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(10)124]。

作者简介: 徐志伟(1965—), 男, 江苏常州人, 助理研究员, 主要从事畜禽养殖研究。E-mail: xzw1729@sina.com。

通信作者: 于建宁, 博士, 副研究员, 主要从事生物技术研究。Tel: (025)84390341; E-mail: jianningyu@gmail.com。

[11] 蔡宝祥. 我国畜禽传染病防制研究的发展水平和发展动向[J]. 中国禽业导刊, 1999(1): 17–20.

[12] 张克山, 刘永杰, 尚佑军, 等. 近年羊传染病流行特点及防控措施[J]. 兽医导刊, 2013(12): 43, 60.

[13] 万玛吉. 海南牧区绵羊传染病、寄生虫病和中毒病的防治[J]. 动物医学进展, 2008, 29(增刊): 86–87.

[14] 姚尚旦. 外界气候条件与牛羊疾病[J]. 中国兽医科技, 1987(3): 29–32.

[15] 白 冰, 文亦蒂. 南方草地可持续发展与思考[J]. 四川草原, 2005(2): 49–51.

[16] 皇甫江云, 卢欣石, 赵熙贵, 等. 贵州草地资源现状及开发利用对策[J]. 草业科学, 2009, 26(9): 70–76.

[17] 杨保平, 阎奋民. 甘肃高山细毛羊营养问题及对策[J]. 甘肃畜牧兽医, 2000, 30(6): 43–44.

[18] 胡跃高, 李志坚, 赵环环, 等. 绿色饲料的地位及其生产与研究进展[J]. 自然资源学报, 2000, 15(2): 194–196.

[19] 马寿福, 三智卓玛. 浅谈祁连县畜牧业配套设施建设[J]. 青海

草业, 2009, 18(1): 26–28.

[20] 赵永刚. 浅析猪、牛、羊疾病的科学防治方法[J]. 农民致富之友, 2013(14): 181.

[21] 王光雷. 牛羊寄生虫病的综合防治[J]. 兽医导刊, 2013(12): 39–42.

[22] 彭 祺, 王 宁, 张锦俊. 放牧与草地植物之间的相互关系[J]. 宁夏学院学报, 2004, 25(4): 76–79, 96.

[23] 章力建, 李 兵, 张志如. 草原生态系统的服务功能及我国草原的可持续发展对策[J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(3): 35–39.

[24] 郭庭双, 杨振海, 康 威. 中国饲料发展战略探讨[J]. 中国农业资源与区划, 1996(5): 1–4.

[25] 杨予海, 孙佳妮. 环青海湖地区畜牧业和饲料业现状及发展的思考[J]. 饲料工业, 2006, 27(23): 61–63.

[26] 陈大地, 刘桂中, 史荒荒, 等. 国内外畜禽养殖管理现状研究[C]//中国环境科学学会学术年会论文集: 第三卷, 2013.

[27] 高国民. 玉米毛豆秸秆饲料加工及湖羊养殖技术[J]. 现代农村科技, 2012(17): 53–54.

### 1.3 湖羊免疫方法程序

首免:每只羊接种 4 mL 免疫原乳剂,注射方式为皮下与皮内注射,共计 16 个注射点。分别为颌下、背部皮下各 2 个点;后足窝皮下共 2 个点;前腹股沟皮内各 2 个点;后腹股沟皮内各 3 个点注射。二免:首次后第 15 天进行二免,皮下与淋巴结注射,共计 18 个注射点。分别为颌下、背部皮下各 2 个点;前腹股沟皮下各 2 个点;后腹股沟皮下各 3 个点;前后腹股沟淋巴结共计 4 个点。三免:二免后第 10 天进行三免,皮下注射,共计 14 个注射点。分别为颌下、背部皮下各 2 个点;前腹股沟皮下各 2 个点;后腹股沟皮下各 3 个点。四免:三免后第 10 天进行四免,免疫方式同三免。五免:四免后第 10 天进行五免,免疫方式同三免。

### 1.4 血清制备与血清效价测定

分别于三免、四免后 7~8 d 采静脉血 5~10 mL 进行血清分离,采用琼脂扩散法检测血清抗体效价,剩余血清置于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱冻存,标注抗体效价。第 5 次免疫注射后第 7~10 天经抗体效价检测,若供血羊准备重复利用,则每只羊根据体质量采血 280~320 mL;若供血羊不准备重复利用,则将所有血采完,根据羊的体质量一般可采血 900~1 200 mL。将所得的全血放入容器内,  $38^{\circ}\text{C}$  水浴中静置 1.5~2.0 h,使血清充分析出,取出置于  $4\sim5^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存过夜。

### 1.5 琼脂板配制

配制 0.01 mol/L PBS 液,配方为 NaCl 4.25 g、磷酸氢二钠 1.35 g、磷酸二氢钠 0.195 g、蒸馏水 500 mL 混匀, pH 值 7.4。取 100 mL PBS 液置于烧杯中,加入优质琼脂 1 g, 2% 叠氮钠或 1% 硫柳汞 1.0 mL,沸水中融化均匀,将已融化的琼脂趁热倒入平皿中,制成 3 mm 厚的琼脂板,冷却后备用。

### 1.6 结果判定

分别设置标准阴性对照孔、标准阳性对照孔,在标准阳性对照孔与抗原孔之间出现明显的致密白色沉淀线,标准阴性孔不出现沉淀线的前提下,将被测孔与对照孔进行比对,以判定阴阳性。利用 Excel 软件记录数据,并进行相关分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 血清的产出

从接种人 ApoB 抗原的羊体中,通过颈静脉采血 10~20 mL,装于离心管中倾斜放置,放于  $38^{\circ}\text{C}$  水浴箱中孵育 1.5~2.0 h,再放入  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜。第 2 天在无菌操作台上操作,移液器吸取血清上清液,放于指形管中,在指形管标记人 ApoB 及日期成功获得人 ApoB 血清上清液。经离心沉淀分出血清,根据每批血清的抗体效价进行抗体标准浓度调整与稀释,分装后置于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱冷冻保存。

### 2.2 血清效价及检测结果

通过琼脂扩散法检测血清效价,结果表明,三免后,血清抗体效价为  $1:2^6$ ,四免时增长到  $1:2^8$ ,五免抗体效价为  $1:2^{10}$ ,达到后续用于制备检测试剂盒或者其他医学用途的抗体水平(表 1)。

表 1 免疫后人 ApoB 多抗血清效价比较

免疫原	三免	四免	五免
人 ApoB	$1:2^6$	$1:2^8$	$1:2^{10}$

### 2.3 抗体生成规律

如图 1 所示,以效价对  $\log_2$  作图,结果显示:四免后所采集抗人 ApoB 血清效价比三免提高 2 个数量级(或更高),五免比四免提高 2 个数量级(或更高)。笔者认为,五免后 7 d 内抗体效价可能升幅不高,10~20 d 左右抗体效价处于高平台期。

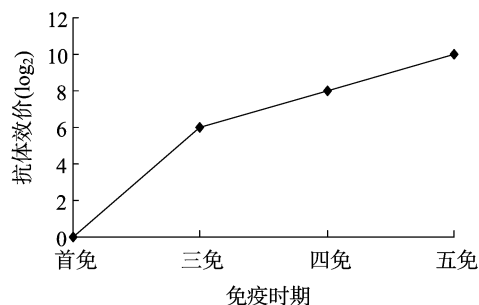


图 1 免疫后抗体效价生成规律

## 3 结论与讨论

联合检测载脂蛋白 A 与载脂蛋白 B (ApoB) 对血脂的判断具有重要的临床价值<sup>[3-4]</sup>。由于 ApoB 在脂质组装、转运过程中起核心作用, ApoB 基因的遗传变异可能帮助解释脂质水平与严重动脉粥样硬化、冠心病之间的关系。测定载脂蛋白及脂蛋白 HDL、LDL 对分析病理发生状态很有帮助。由此可见 ApoB 对于医学诊断及疾病治疗的重要性。目前生产大量抗血清,主要采用大型家畜,包括马、绵羊、山羊等,这类家畜寿命较长,容易管理,不必施行麻醉即可从颈静脉采集大量血液,故主要用于抗血清的商品化生产<sup>[6]</sup>。本试验的主要创新点在于免疫程序方面,常规的免疫程序中注射方式一般都为皮下注射,本试验中首免时将腹股沟的皮下调整为皮内注射,这样注射的好处是二免时淋巴结会肿大,方便进行淋巴结注射,淋巴结注射亦是本试验的创新点,淋巴结是重要的免疫器官,理论上抗体生成效率更高,本试验五免之后的抗体效价能达到  $2^{10}$ , 达到预期水平,可用于后期的商业化生产,具有较高的经济收益。本试验需要免疫 5 次,抗体效价才能符合生产要求,一方面 2 种抗体效价检测方法不同,不具备可比性;另一方面推测免疫原本身在羊上不易产生高的效价,尚需进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Uchide T, Tohya Y, Onda K, et al. Lipoprotein B (apoB) concentrations in lipoproteins in cows [J]. Vet Med Sci, 1997, 59 (8): 711-714.
- [2] 姜伟超, 张德太, 张科, 等. 糖尿病及急性冠状动脉综合征患者 ApoB 与 ApoA1 比值测定的临床意义 [J]. 临床血液学杂志: 输血与检验版, 2013, 26 (6): 837-840.
- [3] Hirata T, Fujioka M, Takahashi Ka, et al. ApoB C7623T polymorphism predicts risk for steroid-induced osteonecrosis of the femoral head after renal transplantation [J]. Journal of Orthopaedic Science, 2007, 12 (3): 199-206.
- [4] 陈保生. 载脂蛋白的结构和功能与病毒病的预防和治疗 [J]. 中国医学科学院学报, 2007, 29 (3): 448-451.