

尹柏双,王秋竹,付连军,等. 不同程度隐性乳房炎奶牛乳清中结合珠蛋白的变化[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):289-290.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.090

不同程度隐性乳房炎奶牛乳清中结合珠蛋白的变化

尹柏双^{1,2}, 王秋竹¹, 付连军¹, 郝景锋¹, 沙万里¹

(1. 吉林农业科技学院动物科技学院, 吉林吉林 132101; 2. 长白山动植物资源利用与保护吉林省高校重点实验室, 吉林吉林 132101)

摘要:为研究奶牛隐性乳房炎发病程度与乳清中结合珠蛋白(HP)含量变化的关系,选取6头健康奶牛和18头患轻、中、重度隐性乳房炎奶牛为试验动物,采集乳样、分离乳清,利用HP ELISA检测试剂盒测定样品中HP含量。结果发现,随着隐性乳房炎病情加重、乳汁体细胞数的增加,乳清中HP含量逐渐升高,与健康对照组比较升高极显著($P < 0.01$)。结果表明,乳清中HP含量变化与隐性乳房炎发病具有一定相关性,乳腺损伤程度和乳汁体细胞数与乳清中HP含量呈正相关。

关键词:隐性乳房炎;奶牛;乳清;结合珠蛋白

中图分类号: S858.232⁺.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0289-02

奶牛乳房炎是危害奶牛养殖业最严重的疾病之一,其中隐性乳房炎发生率最高。隐性乳房炎可引起泌乳奶牛产奶量下降、牛奶品质降低、养殖成本增加、产后发情延长、妊娠时间推迟,给奶牛养殖业带来巨大经济损失^[1]。结合珠蛋白(HP)是血清 α_2 球蛋白组中的一种酸性糖蛋白,在哺乳动物血液和其他体液中广泛分布,具有结合炎症疾病标记物、游离血红蛋白、抗菌、免疫调节等主要功能^[2-6]。Grönlund等研究表明,在金黄色葡萄球菌引起奶牛乳房炎的急性期,血清结合珠蛋白的表达量增加^[7]。杨永新等研究表明,临床型乳房炎奶牛乳汁中结合珠蛋白表达量显著增加^[8]。本试验研究乳清中结合珠蛋白表达量与不同程度奶牛隐性乳房炎发病的关系,以期对隐性乳房炎判定提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

通过乳汁体细胞计数监测后选择年龄、胎次、产奶量、泌乳期等指标相近的健康奶牛6头和患不同程度奶牛隐性乳房炎奶牛18头,由吉林市某奶牛场提供。

收稿日期:2014-11-10

基金项目:吉林省科技厅重点科技攻关项目(编号:20130206040NY);吉林省教育厅“十二五”科学技术项目(编号:吉教科合字2013339);吉林市科技局杰出青年培育专项(编号:2013625019);吉林农业科技学院重点学科培育项目(编号:吉农科合字2013X021)。

作者简介:尹柏双(1978—),男,黑龙江哈尔滨人,博士,副教授,从事奶牛乳腺疾病方向的研究工作。E-mail: ybs3421@126.com。

质代谢影响[J]. 中国饲料,2012,(19):22-25.

[10]王鹏,王安,李丽娟. 饲料中色氨酸对0~3周龄肉仔鸡生长性能及血液生化指标的影响[J]. 饲料工业,2010,31(20):8-11.

[11]程镇燕,陈韶阳,乔秀亭. 鱼类功能性氨基酸营养免疫研究进展[J]. 饲料研究,2014(9):52-57.

[12]Lepage O, Tottmar O, Winberg S. Elevated dietary intake of

1.2 主要试剂与仪器

结合珠蛋白(HP)含量测定用HP ELISA试剂盒,购于南京建成生物试剂研究所;主要仪器有Fossmatic 5000体细胞计数仪(FOSS公司,丹麦)、Varioskan酶标仪(Thermo公司,美国)、离心机(Sigma公司,美国)。

1.3 试验动物分组

通过乳汁体细胞计数监测后将试验奶牛分成健康对照组[6头,体细胞数量(SCC) $< 10 \times 10^4$ 个/mL]、轻度隐性乳房炎组(6头, 50×10^4 个/mL $< \text{SCC} < 150 \times 10^4$ 个/mL)、中度隐性乳房炎组(6头, 150×10^4 个/mL $< \text{SCC} < 500 \times 10^4$ 个/mL)、重度隐性乳房炎组(6头, $\text{SCC} > 500 \times 10^4$ 个/mL)。

1.4 乳样采集

采集试验奶牛的乳汁,采样前对乳区进行清洗,然后用70%乙醇消毒乳区,弃掉前3把乳汁,分别采10 mL乳装入无菌试管中,将采集的乳样放到冰盒中,带回实验室检测。

1.5 乳清制备

将采集的乳样于3 000 r/min离心5 min,除去上层乳脂,然后于16 000 r/min高速离心机中离心10 min,去除沉淀,保留上清,4℃条件下保存、待测。

1.6 检测方法

乳汁体细胞计数采用体细胞计数仪测定;HP含量采用HP ELISA试剂盒测定,在酶标仪上比色测定 $D_{450 \text{ nm}}$ 吸光值,根据试剂盒说明绘制标准曲线后计算HP含量。

1.7 数据处理

采用SPSS 17.0数据分析系统作单因素方差分析,结果以“均值±标准差”表示, $P < 0.01$ 为差异极显著, $P < 0.05$ 为

L-tryptophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. The Journal of Experimental Biology, 2002, 205 (Pt 23): 3679-3687.

[13]Koopmans S J, Ruis M, Dekker R, et al. Surplus dietary tryptophan reduces plasma cortisol and noradrenaline concentrations and enhances recovery after social stress in pigs [J]. Physiology & Behavior, 2005, 85 (4): 469-478.

差异显著。

2 结果与分析

2.1 乳清中结合珠蛋白标准曲线及回归方程

通过 ELISA HP 检测试剂盒检测 5 个浓度梯度的 HP 标样的 $D_{450\text{ nm}}$,利用 ELISA Calc 回归/拟合软件进行分析。以 HP 浓度为自变量 $X(\mu\text{g/mL})$ 、 $D_{450\text{ nm}}$ 为因变量 Y ,拟合直线回归方程为: $y=0.069\ 54x+0.144\ 46$, $r^2=0.998\ 51$,浓度与吸光度线性回归良好,表明该方法检测样品值可信度较高(图 1)。

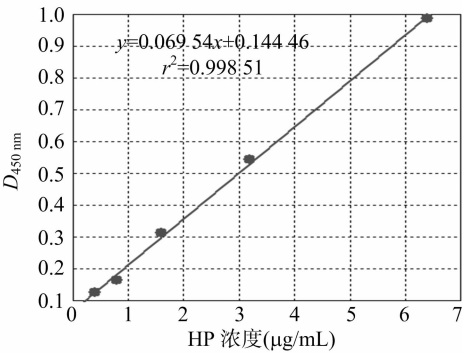


图1 乳清中 HP 含量检测标准曲线

2.2 乳清中结合珠蛋白检测结果

由表 1 可知,患轻度乳房炎奶牛乳清中 HP 含量为 74.111 $\mu\text{g/mL}$,极显著高于健康对照组;同样,患中、重度乳房炎奶牛乳清中 HP 含量也极显著高于健康对照组。此外,随着乳房炎病情加重、乳汁体细胞数增加,乳清中 HP 含量逐渐升高,表明乳腺损伤程度和乳汁体细胞数与乳清中 HP 含量呈正相关。

表 1 奶牛乳清中 C-反应蛋白含量

组别	样品数量(个)	HP 含量($\mu\text{g/mL}$)
健康对照组	6	32.573 \pm 4.947
轻度乳房炎组	6	74.111 \pm 10.357 **
中度乳房炎组	6	77.093 \pm 4.394 **
重度乳房炎组	6	86.146 \pm 8.521 **

注:“**”表示与对照组比较差异极显著($P<0.01$)。

3 讨论

结合珠蛋白主要由肝脏合成,参与机体的免疫应答,属急性期反应蛋白,其表达受细胞因子和前列腺素(PG)等不同因素的调节,炎症、创伤和感染等病理状态也会影响血液 HP 含量的变化^[9]。Khoshvaghpi 等研究患有外科感染、急性子宫炎奶牛血清和牛奶中 HP 变化结果表明,血清和牛奶中 HP 浓度均高于健康奶牛^[10]。杨永新等研究结果表明,大肠杆菌性乳房炎奶牛血浆中结合珠蛋白表达量显著高于健康奶牛^[11];试验诱导或自然发生的大肠杆菌乳房炎奶牛血清中结合珠蛋白的浓度增加^[12-13];患轻度乳房炎奶牛血清和牛奶中 HP 含量均升高^[14];陈国灿等检测自然感染隐性乳房炎奶牛乳汁中的结合珠蛋白浓度结果表明,奶牛患隐性乳房炎时,其肝脏合成的 HP 增加,导致乳汁中 HP 含量也增加^[15];Grönlund 等报道,患金黄色葡萄球菌性乳房炎的奶牛,在急性期时乳汁和血清中 HP 含量迅速升高^[7,16]。本试验结果表明,与健康对照组相比,患隐性乳房炎奶牛乳清中 HP 含量极显著升高,随着

隐性乳房炎病情加剧,乳汁中 HP 含量逐渐升高,这与以往研究结果基本一致。在临床兽医学领域针对我国奶牛隐性乳房癌高发病率和诊断技术相对落后的情况下,利用乳清中 HP 含量变化的特点,开展早期快速诊断将具有广阔的研究空间和发展前景。

4 结论

本研究结果表明,乳清中 HP 含量变化与隐性乳房炎发病具有一定相关性,随着乳腺损伤程度和乳汁体细胞数增加,乳清中 HP 含量显著升高。

参考文献:

[1] 吴美玲,付静涛,王江涛,等. 影响奶牛隐性乳房炎发病率的主要因素[J]. 黑龙江畜牧兽医,2014,2(4):49-50.

[2] 杨 宇,李庆章,吕 英. 结合珠蛋白在奶牛乳房炎研究中的进展[J]. 中国奶牛,2010(10):47-49.

[3] Sadrzadeh S M,Bozorgmehr J. Haptoglobin phenotypes in health and disorders[J]. American Journal of Clinical Pathology,2004,121(Suppl):97-104.

[4] Ebersole J L,Cappelli D. Acute phase reactants in infections and inflammatory disease[J]. Periodontology,2000,23(1):19-49.

[5] Nakagawa H,Yamamoto O,Oikawa S,et al. Detection of serum haptoglobin by enzyme-linked immunosorbent assay in cows with fatty liver[J]. Research in Veterinary Science,1997,62(2):137-141.

[6] Wagner L,Gessl A,Parzer S B,et al. Demonstration of haptoglobin uptake into peripheral blood neutrophils and monocytes[J]. Journal of Immunology,1996,156(5):1989-1996.

[7] Grönlund U,Hultén C,Eckersall P D,et al. Haptoglobin and serum amyloid A in milk and serum during acute and chronic experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis[J]. The Journal of Dairy Research,2003,70(4):379-386.

[8] 杨永新,王加启,卜登攀,等. 不同体细胞数牛乳中乳蛋白的比较蛋白质组学研究[J]. 中国农业科学,2011,44(12):2545-2552.

[9] 谭丽娜,黄进华. 结合珠蛋白的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志,2006,26(1):43-47.

[10] Khoshvaghpi A,Nazifi S,Vafafar A,et al. Evaluation of serum and milk haptoglobin in some inflammatory diseases of cattle[J]. J Vet Res,2009,3(1):31-36.

[11] 杨永新,程广龙,赵辉玲,等. 大肠杆菌性乳房炎奶牛血浆的比较蛋白质组研究[J]. 畜牧兽医学报,2010,41(9):1191-1197.

[12] Salonen M,Hirvonen J,Pyörälä S,et al. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin in experimentally induced *Escherichia coli* mastitis[J]. Research in Veterinary Science,1996,60(1):88-91.

[13] Suojala L,Orro T,Järvinen H,et al. Acute phase response in two consecutive experimentally induced *E. coli* intramammary infections in dairy cows[J]. Acta Veterinaria Scandinavica,2008,50:18.

[14] Eckersall P D,Young F J,Mccomb C,et al. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis[J]. The Veterinary Record,2001,148(2):35-41.

[15] 陈国灿,王九峰,马金磊,等. 奶牛隐性乳房炎诊断新方法探讨[J]. 中国兽医杂志,2005,41(9):31-32.

[16] Grönlund U,Hallén S C,Persson W K. Haptoglobin and serum amyloid A in milk from dairy cows with chronic sub-clinical mastitis[J]. Veterinary Research,2005,36(2):191-198.