

张保平,李娜,高惠林,等. 抗豪猪大肠杆菌卵黄抗体的制备[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):133-135.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.038

抗豪猪大肠杆菌卵黄抗体的制备

张保平¹,李娜²,高惠林¹,王前光¹,任国冀¹,童学勤³

(1. 常德职业技术学院农林工程系,湖南常德 415000; 2. 湖南文理学院/动物学湖南省高校重点实验室,湖南常德 415000;
3. 湖南省桃源县堆金豪猪养殖基地,湖南桃源 415000)

摘要:采用甲醛灭活的仔豪猪腹泻大肠杆菌为抗原,免疫健康140日龄桃源蛋鸡,刺激机体反应生成血清抗体和卵黄抗体,并采用平板凝集试验检测抗体效价,研究获得含有高效价血清和高免蛋的最佳条件。结果表明,双翼下静脉注射 10^{12} CFU/mL大肠杆菌悬浮液的最佳免疫剂量为1 mL/次。在大肠杆菌悬液中添加等量的完全福氏佐剂对免疫应答加强的程度最高。强化免疫程序能大大加强产蛋母鸡的免疫应答强度,其中初免后,每周强化免疫1次,连续4次,效果最好。无菌检测及动物安全性试验表明,制备的卵黄抗体安全可靠。制备的卵黄抗体效价和血清抗体效价变化幅度小,稳定性好,持续时间长,为临床上防治仔豪猪腹泻大肠杆菌病提供了新的手段。

关键词:大肠杆菌;豪猪;蛋鸡;血清抗体;卵黄抗体;免疫应答强度;制备

中图分类号: S858.285.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)10-0133-03

豪猪(*porcupines*)别称箭猪、刺猪,在动物分类学上属于哺乳纲啮齿目豪猪科^[1-3],是一种经济价值很高的珍稀动物,具有食用价值、药用价值和观赏价值^[4-5]。豪猪的抗病能力很强,很少发生疾病,仔豪猪腹泻是引起豪猪死亡的主要病因。鸡卵黄抗体(IgY)是蛋鸡受免疫刺激后,鸡体内产生免疫应答,血液中免疫球蛋白G(IgG)被选择性地转移到卵黄中唯一的免疫球蛋白类^[6]。与哺乳动物的IgG相比,鸡蛋的IgY具有取材方便、提取方法比较简单、产量高、稳定性较好等优点,可作为口服剂或饲料添加剂用于预防和治疗动物早期的消化道疾病^[7]。我国豪猪的养殖尚处于起步阶段,对豪猪的研究主要在繁殖、营养和生理等方面^[8-10],有关豪猪疾病防治的研究报道较少。本研究以仔豪猪腹泻大肠杆菌为抗原,获得含有高效价卵黄抗体的免疫鸡蛋的最佳条件,为大量制备特异性卵黄抗体防治仔豪猪大肠杆菌腹泻病提供重要依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物 纯种桃源蛋鸡140日龄,购自湖南省桃源县良种场。试验期间试验鸡日常管理与卫生防疫按常规进行。

1.1.2 试验菌株 仔豪猪腹泻大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株,由常德职业技术学院农林工程系微生物实验室自行分离

收稿日期:2016-11-24

基金项目:国家星火计划(编号:2015GA770010);湖南省教育厅科学研究项目(编号:12C0974、14C0805);湖南省常德市科技计划(编号:2012CK03、2011CK01);湖南文理学院研究生科学院省级平台开放科研项目(编号:SKYPT201607)。

作者简介:张保平(1978—),男,河北景县人,硕士,讲师,研究方向为预防兽医学。E-mail:bpzhang2007@126.com。

通信作者:李娜,硕士,讲师,研究方向为动物病原微生物与免疫学。E-mail:vetlina@163.com。

鉴定并传代培养得到^[11]。

1.1.3 主要试剂 牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、琼脂、氢氧化钠、磷酸二氢钠、甲醛、三氯甲烷、硫酸铵(分析纯)等,购自浙江省杭州微生物试剂有限公司;弗氏佐剂,购自北京鼎国昌盛生物有限责任公司;10号白油(食品级)、司班-80、硬脂酸铝、磷酸氢钠(分析纯)等,购自上海化学试剂总厂;卡拉胶、低甲氧基果胶和氯化钙,购自天津市福辰化学试剂厂。

1.1.4 主要仪器 立式高压蒸汽灭菌锅,购自上海东亚压力容器制造公司;生化培养箱、干燥箱,购自上海一恒科学仪器有限公司;电子天平,购自北京赛多利斯仪器有限公司;超净台,购自中国上海浦东物理光学仪器厂;医用血球计数板,购自江苏医用电子仪器公司;注射器,购自四川省成都市双流大陆医疗器械公司;冰箱,购自海尔有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 培养基与免疫佐剂配制方法 (1)牛肉膏蛋白胨培养基。按常规方法^[12]制备,高压灭菌,置于4℃冰箱中保存,备用。(2)白油佐剂。取96 mL的10号白油放入烧杯中,文火加热,当温度达160℃以上时,边搅拌边加入56℃水浴中预热30 min的司班-80 2 mL和硬脂酸铝4 g,当后者完全溶解,混合液呈透明胶冻状时,小量分装,高压灭菌后4℃保存备用。

1.2.2 抗原制备 将仔豪猪腹泻大肠杆菌接种于牛肉膏蛋白胨固体培养基中,37℃培养24 h,用无菌0.01 mol/L磷酸缓冲液(PBS, pH值7.2),小心冲洗菌苔,调成浓度为 10^{12} CFU/mL菌液,再加甲醛溶液至终浓度为0.4%,37℃灭活24 h,在此过程中每隔2 h摇匀1次,灭活完毕4℃保存。

取灭活的大肠杆菌液分别与等量佐剂乳化混合,当溶液乳化至滴在水面上呈“油包水”状,即合格,否则继续乳化,3种佐剂与灭活菌的乳化制备方法相同,4℃保存。

1.2.3 产蛋鸡免疫方案 桃源蛋鸡分组,6羽/组,分2笼饲养,按照免疫抗原的不同剂量、佐剂种类和间隔时间等3种免疫强化方式分组。(1)不同剂量的免疫抗原。分3组,菌体

浓度依次是 10^{10} 、 10^{12} 、 10^{14} CFU/mL。(2)不同佐剂依次是完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂和10号白油3个组。(3)免疫强化方式分组。程序1:初免1次,无免疫强化;程序2:初免后每周免疫强化1次,连续4周;程序3:初免后每2周免疫强化1次,连续4次。

1.2.4 高免卵黄抗体的制备 收集未免疫鸡蛋,初次免疫接种当天记为0 d,以后每周收集免疫蛋作为样本,依次编号记录,4℃保存,连续收集9周,同时设未免疫对照组,注射PBS乳化剂。先将收集的鸡蛋用清水洗净,再喷洒0.1%新洁尔灭消毒,无菌收集卵黄。分离卵黄与等量PBS混匀,然后加4倍体积的脱脂溶液^[13](含0.06%卡拉胶、0.18%低甲氧基果胶和10 μmol/L氯化钙)混匀,于12 000 r/min、4℃下离心25 min,取上清;再加硫酸铵至终浓度330 mg/mL,混匀,4℃下放置1 h,12 000 r/min下离心25 min,取沉淀用PBS溶解,加入硫酸铵至终浓度为200 mg/mL,混匀,放于透析袋内透析,无菌过滤后加0.01%硫柳汞和青链霉素1 000 IU/mL,小量分装,-20℃保存。

1.2.5 蛋鸡血清抗体的制备 免疫前1 d采血,免疫后每周自鸡翅静脉采血1 mL,分离血清,于3 500 r/min下离心5 min除红细胞,标记,置于-20℃下冻存,连续采血9周。

1.2.6 抗体效价测定 采用平板凝集试验进行抗体效价测定。96孔“V”形微量血凝板中加入灭菌生理盐水25 μL/孔,再吸抗体25 μL加入第1孔中,混匀,吸混合液25 μL于第2孔,混匀,吸混合液25 μL于第3孔,依次倍比稀释至256倍(即第8孔,多余25 μL溶液吸弃);留第9孔作空白对照,加

灭菌生理盐水25 μL。加仔豪猪腹泻大肠杆菌抗原(含菌量为 10^{12} CFU/mL)25 μL/孔,混匀各孔中溶液(每孔更换枪头),微量血凝板放振荡器上振荡,2~3 min后记录每孔凝集现象,对照孔溶液应为均匀浑浊。与对照孔中溶液一样浑浊者判定为无凝集反应,记为“-”;凡是孔中溶液有肉眼可见絮状凝集块者,判定为有凝集反应,记录为“+”,絮状凝集块愈多,阳性反应判定愈强,分别用“++”“+++”“++++”表示。凡发生凝集反应结果判定为“++”的最高稀释度即是该样本抗体效价,效价用 \log_2 (稀释倍数, x)表示。

2 结果与分析

2.1 免疫菌液浓度对卵黄抗体效价和鸡血清抗体的影响

不同浓度(含菌数 10^{10} 、 10^{12} 、 10^{14} CFU/mL)的大肠杆菌悬浮液1 mL分别免疫蛋鸡,无佐剂,经翅静脉注射1次,免疫后特定时间收蛋和采血,测定卵黄抗体和血清抗体效价,结果如图1所示。从图1-a可以看出,不同浓度菌液免疫的鸡蛋卵黄抗体的效价有较大差异,其中 10^{10} CFU/mL菌量免疫的鸡蛋卵黄抗体效价明显低于 10^{12} 、 10^{14} CFU/mL菌量免疫的鸡蛋,但 10^{12} 、 10^{14} CFU/mL菌量免疫的鸡蛋卵黄抗体效价差别不明显。将图1-b和图1-a对比可知,在同等条件下,被免疫鸡的血清抗体效价比卵黄抗体效价略高,但就变化趋势看,卵黄抗体效价与血清抗体效价的变化规律基本相同,均呈先上升再平稳后下降的趋势,并且基本同步。因此,选择注射菌液浓度为 10^{12} CFU/mL的大肠杆菌悬浮液1 mL作为最佳免疫剂量。

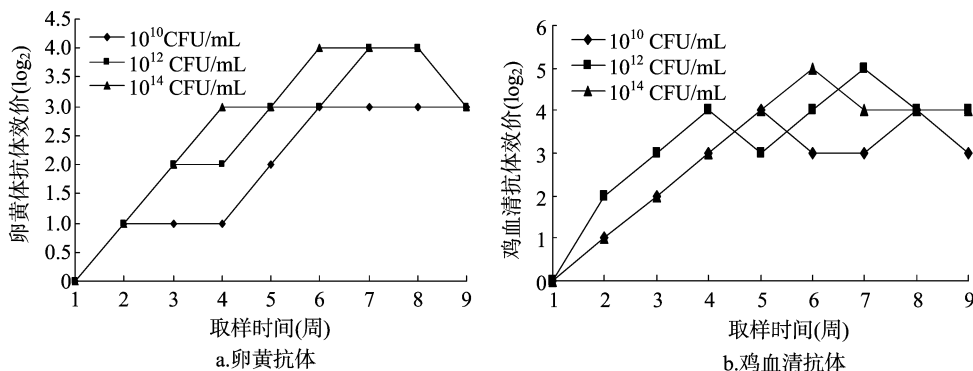


图1 抗原免疫菌液浓度对卵黄抗体效价、鸡血清抗体效价的影响

2.2 不同免疫佐剂对卵黄抗体和鸡血清抗体效价的影响

对蛋鸡注射菌液浓度是 10^{12} CFU/mL菌悬浮液1 mL,添加不同佐剂(完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂和10号白油),经翅静脉免疫注射1次,免疫后不同时间收蛋和采血测卵黄抗体和血清抗体效价;同时无佐剂免疫组同步免疫,作阴性对照,结果如图2所示。研究发现,佐剂的添加均可在一定程度上提高卵黄抗体和血清抗体的效价。但从3种佐剂产生的免疫应答看,完全弗氏佐剂效果最好,不完全弗氏佐剂和白油佐剂效果略差,且两者对免疫应答的加强作用差异不明显。添加完全弗氏佐剂后,可使6周收集的免疫蛋卵黄抗体效价从 $3\log_2$ 上升到 $5\log_2$,同时6周采集的血清抗体效价从 $4\log_2$ 上升至 $7\log_2$,增加幅度明显。因此,在制备免疫原时选择大肠杆菌菌液与弗氏完全佐剂等量混合。

2.3 不同强化免疫程序对卵黄抗体和鸡血清抗体效价的影响

影响

给蛋鸡免疫浓度是 10^{12} CFU/mL菌悬液1 mL,添加等量弗氏完全佐剂,经翅静脉注射,不同程序强化免疫,免疫后不同时间收蛋和采血,测卵黄抗体和血清抗体效价,结果如图3所示。图3显示,与未进行免疫强化的程序1相比,2种免疫强化的程序2、程序3均可明显提高卵黄抗体和血清抗体效价。重要的是,在未进行免疫强化的鸡血清和卵黄中,其抗体效价分别在8、9周明显下降,但免疫强化后,下降趋势或者被推迟出现或者被完全消除。对比3种免疫程序发现,程序2和程序3在效果上差异不明显,因此为节约时间,选择采用免疫强化程序2对蛋鸡进行免疫。

3 讨论与结论

免疫蛋的制备实质上是对蛋鸡进行抗原免疫,让其在血

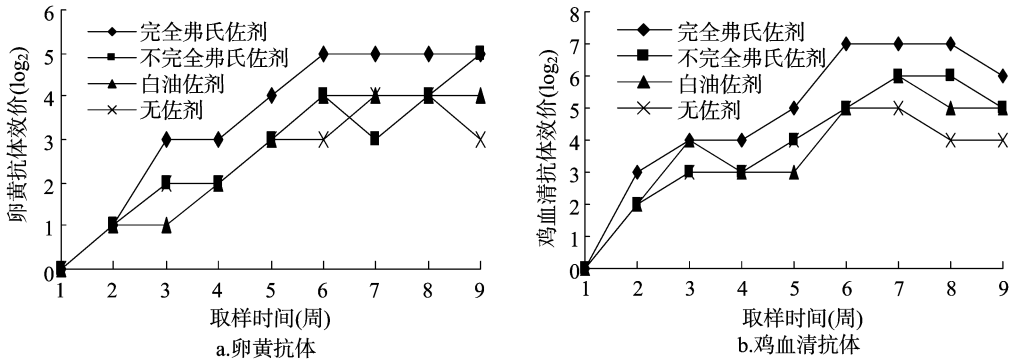


图2 3种不同免疫佐剂对卵黄效价、鸡血清抗体效价的影响

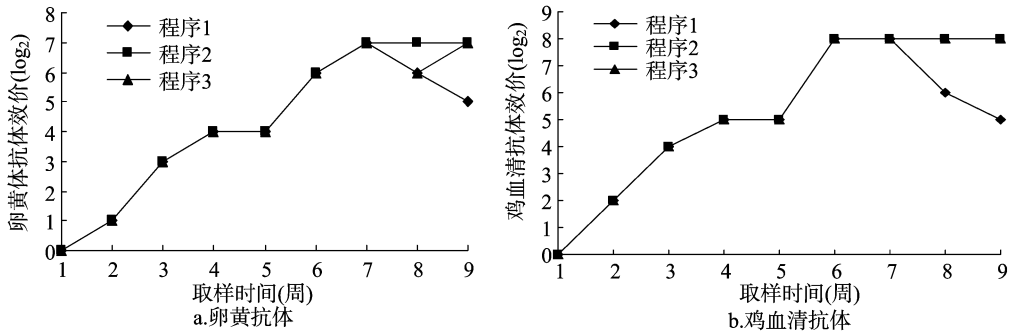


图3 免疫程序对卵黄抗体效价、鸡血清抗体效价的影响

液中产生的抗体转化到蛋黄中贮藏而形成含有较高特异性抗体浓度的鸡蛋。研究显示,抗原进入机体要经过1个潜伏期才会发生免疫作用,细菌抗原多是5~7 d。本研究结果表明,免疫初期,免疫组与对照组卵黄抗体效价和血清抗体效价均无明显差别,说明是处在免疫潜伏阶段。动物在受到抗原刺激后,在免疫应答不同阶段所产生的抗体类别是有差异的。初次应答所产生的抗体水平不高,IgG很少,多数为IgM;但免疫加强后,抗体效价迅速增高,产生抗体则主要为IgG,而IgM很少,此现象的原因是记忆细胞开始重新分化、增殖,产生大量抗体。本研究结果也印证了这一点,在免疫加强后,卵黄抗体和血清抗体效价均有大幅度升高现象。以仔猪大肠杆菌悬浮液对140日龄纯种桃源蛋鸡免疫时,若固定免疫抗原剂量为1 mL,则当菌液浓度低于 10^{12} CFU/mL时,免疫应答强度随免疫剂量的降低而降低;当菌液浓度高于 10^{12} CFU/mL时,免疫应答强度则不会随免疫剂量的增加而得到明显增强。因此,确定免疫菌液浓度是 10^{12} CFU/mL,剂量定为1 mL/次。在菌悬液中分别添加等量完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂和10号白油免疫鸡蛋时,均可明显加强鸡体免疫应答强度,其中弗氏完全佐剂对免疫应答加强的程度最高,且对受试动物无不良作用。初免后,每周强化免疫1次,连续4周的强化免疫程序既经济又有效。本试验研究了仔猪腹泻大肠杆菌高免卵黄抗体及免疫鸡血清抗体的变化规律,制备出了高效价的卵黄抗体和血清抗体。免疫后高效价卵黄抗体可以维持4周以上。试验数据为临床防治仔猪大肠杆菌腹泻病提供了技术依据。

参考文献:

[1]张荣祖. 中国哺乳动物分布[M]. 北京:中国林业出版社,

- 1997:172.
- [2]王玉玺,张淑云. 中国兽类分布名录(四)[J]. 野生动物,1993,14(5):10-11.
- [3]王西之,胡锦囊. 四川兽类原色图鉴[M]. 北京:中国林业出版社,1999:251.
- [4]彭孟德,张晓梅. 特种药用动物养殖与加工技术[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1994:65-68.
- [5]常祖光. 药用豪猪可大力养殖[J]. 农村实用科技信息,2005(9):40.
- [6]王丽英,马美湖,黄群,等. 鸡卵黄免疫球蛋白的mPEG修饰及其稳定性研究[J]. 光谱学与光谱分析,2012,32(9):2501-2507.
- [7]彭玉麟,冯于明. 鸡卵黄免疫球蛋白在畜禽生产中的应用前景[J]. 中国饲料,2002(6):26-28.
- [8]王前光,刘秋,彭慧珍,等. 日粮消化能和蛋白质水平对6~8月龄豪猪生产性能的影响[J]. 西北农业学报,2013,22(5):204-210.
- [9]姜卫星,李伟,唐松元,等. 不同公母配比对提高豪猪繁殖性能的影响[J]. 经济动物学报,2010,14(2):84-86.
- [10]刘军,阳水刚,宾冬梅,等. 豪猪雌性生殖器官的解剖研究[J]. 经济动物学报,2005,9(3):140-142.
- [11]张保平,李娜,高惠林,等. 豪猪致病性大肠杆菌的分离鉴定与药敏试验[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):189-190.
- [12]赵斌,林会. 微生物学实验[M]. 2版. 北京:科学出版社,2014.
- [13]Tan S H, Mohamedali A, Kapur A, et al. A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure[J]. Journal of Immunological Methods,2012,380(1/2):73-76.