

徐志伟,徐小波,于建宁,等.羊抗人 ApoB 高效价抗血清制备方法的建立与优化[J].江苏农业科学,2018,46(23):180-182.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.046

# 羊抗人 ApoB 高效价抗血清制备方法的建立与优化

徐志伟<sup>1</sup>,徐小波<sup>2</sup>,于建宁<sup>2</sup>,刘伟忠<sup>1</sup>

(1.江苏丘陵地区镇江农业科学研究所,江苏句容 212400;

2.江苏省农业科学院畜牧研究所/农业部种养结合重点实验室,江苏南京 210014)

**摘要:**用人 ApoB 抗原免疫湖羊,通过不同免疫剂量、不同免疫途径及不同羊年龄的比较,初步形成了羊抗人 ApoB 高效价抗血清的制备方法。结果表明,3 个免疫剂量以 0.4 mg/(次·头)免疫效果最好,免疫剂量过低[0.2 mg/(次·头)]与过高[1.0 mg/(次·头)]都不利于抗体的产生。3 种免疫途径中肌肉注射反应较差,皮下多点、皮内+淋巴 2 种途径效果一致,但皮下注射操作相对比较方便。15~22 月龄的成年羊对 ApoB 抗原的反应强度明显高于 6~10 月龄的幼年羊与 28~42 月龄的老年羊。

**关键词:**ApoB 抗原;免疫剂量;免疫途径;湖羊年龄;抗体效价

**中图分类号:**S852.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)23-0180-03

载脂蛋白(apolipoprotein,简称 Apo)是指血浆脂蛋白中的蛋白质部分,Apo 既是脂蛋白的构成部分,又具有稳定脂蛋白的功能,同时能修饰并影响与脂代谢有关的酶活性<sup>[1]</sup>。ApoB 与胆固醇组成低密度脂蛋白(low density lipoprotein,简称 LDL),能识别 LDL 受体,介导 LDL 代谢<sup>[2-3]</sup>,所以 ApoB 在维持体内血脂恒定、脂类代谢与转运中发挥重要作用。因此,人 ApoB 的检测在糖尿病、冠状动脉综合征等心血管疾病的诊断和临床治疗方面具有重要意义<sup>[4-5]</sup>。可通过测定 ApoB

反映低密度脂蛋白指标,而且 ApoB/ApoA1 的值是动脉粥样硬化等疾病预测和诊断的重要参考。测定载脂蛋白及脂蛋白对分析心血管类疾病的状态很有价值<sup>[4]</sup>。然而用于检测 ApoB 的试剂盒尚不成熟,其难点是制备高效价和高特异性的免疫血清,目前通过大动物免疫获得血清中的抗体效价一般都不高,提高抗体效价的研究是很有价值的。

本试验研究用人 ApoB 抗原免疫湖羊,通过不同免疫剂量、不同免疫途径及不同羊年龄的比较,形成并优化羊抗人 ApoB 高效价抗血清的制备方法,以期规模化生产奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 试验羊与试验期 试验在江苏省句容市行香羊场实

收稿日期:2017-08-15

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(16)1054]

作者简介:徐志伟(1965—),男,江苏常州人,硕士,副研究员,主要从事畜禽高效养殖方面的研究。E-mail:xzw1729@sina.com。

通信作者:徐小波,研究员,主要从事家畜育种与生产研究。  
E-mail:119649103@qq.com。

[19]胡海平,王代懿,张丰松,等.东北三省不同规模养殖场畜禽饲料和粪便中锌含量特征[J].环境科学研究,2013,26(6):689-694.

[20]索超,李艳霞,张增强,等.北京集约化养殖畜禽饲料 Zn 含量及粪便 Zn 残留特征研究[J].农业环境科学学报,2009,28(10):2173-2179.

[21]黄顺捷.上海市郊规模化养猪场锌的应用状况调查研究[D].福州:福建农林大学,2012.

[22]Cang L, Wang Y J, Zhou D M, et al. Study of heavy metals pollution in poultry and livestock feeds and manures under intensive farming in Jiangsu Province[J]. Journal of Environmental Sciences, 2004, 16(3):371-374.

[23]冯秉福,赵新全,曹俊虎.微量元素锌在动物生产中的作用[J].中国畜牧兽医,2008,435(6):26-29.

[24]Nicholson F A, Chambers B J, Williams J R, et al. Heavy metal contents of livestock feeds and animal manures in England and Wales[J]. Bioresource Technology, 1999, 70(1):23-31.

[25]Jensen J, Larsen M M, Bak J. National monitoring study in Denmark finds increased and critic levels of copper and Zn in arable soils

fertilized with pig slurry[J]. Environmental Pollution, 2016, 214:334-340.

[26]赵昕红,李德发,田福刚,等.高锌和高铜对仔猪生长性能、免疫机能和抗氧化酶活性的影响[J].中国农业大学学报,1999,4(1):91-96.

[27]Hernandez A, Pluske J R, Souza D D, et al. Levels of copper and Zn in diets for growing and finishing pigs can be reduced without detrimental effects on production and mineral status[J]. Animal, 2008, 2(12):1763-1771.

[28]苟兴能,奉向东,张有志,等.饲料中高铜高锌的不同停用时间对猪生长性能和猪肉品质的影响[J].中国饲料,2009(12):31-32.

[29]Peter C M, Parr T M, Parr E N, et al. The effects of phytase on growth performance, carcass characteristics, and bone mineralization of late-finishing pigs fed maize-soyabean meal diets containing no supplemental phosphorus, Zn, copper and manganese[J]. Animal Feed Science and Technology, 2001, 94(3):199-205.

[30]中华人民共和国农业部.第 2 625 号公告 饲料添加剂安全使用规范[EB/OL]. [2018-01-03]. http://www.moa.gov.cn.

施,试验期(含预试 7 d)为 2017 年 5 月 8 日至 2017 年 6 月 20 日。选择该羊场健康湖羊公羊,幼年羊 10 头(6~10 月龄,平均 7.4 月龄,平均体质量 42.4 kg);成年羊 70 头(15~22 月龄,平均 18.6 月龄,平均体质量 50.9 kg);老年羊 10 头(28~42 月龄,平均 35.1 月龄,平均体质量 62.9 kg)。为利于羊身体健康和获得好的试验效果,采用放牧和舍饲相结合的饲养方法,白天放牧 4 h,上午、下午各 2 h,晚上饲喂精料 1 次,15 d 后开始试验。

1.1.2 抗原与佐剂 ApoB 抗原购自元升生物科技(上海)有限公司,纯度为 96%;完全弗氏与不完全弗氏佐剂购自 Sigma 公司。

1.2 试验设计

1.2.1 不同免疫剂量比较 将 30 头成年羊按月龄和体质量平均分为 3 组;免疫途径为皮下多点注射,注射点分别为腹股沟 3 个点、肘部 2 个点、颌下 1 个点、背侧 2 个点、耳后 1 个点,2 侧共计 18 个点;抗原量分别为第 1 组 0.2 mg/(次·头),第 2 组 0.4 mg/(次·头),第 3 组 1.0 mg/(次·头),无论抗原量多少,均统一用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,简称 PBS)+完全弗氏与不完全弗氏佐剂乳化 2 mL 量;免疫程序:共计 5 次免疫,第 1 次、第 2 次间隔 15 d,第 2 次至第 5 次均间隔 7 d。

1.2.2 不同免疫途径比较 试验羊分组与不同免疫剂量比较试验相同,免疫剂量均为 0.4 mg/(次·头);免疫程序同“1.2.1”节;免疫途径:第 1 组为肌肉多点注射,后腿肌肉群 3 个点、前腿肌肉群 2 个点、颌下 1 个点、背侧 2 个点、耳后 1 个点,2 侧共 18 个点;第 2 组为皮下多点注射同“1.2.1”节;第 3 组为皮内+淋巴多点注射,第 1 次免疫 18 个点位置同“1.2.1”节(皮下改成皮内);第 2 次免疫 18 点的同时,另加 2 侧腹

股沟淋巴结,共 20 个点;第 3~7 次免疫仍然免疫 18 个点。

1.2.3 不同羊年龄比较 试验羊分为 3 组,分别为幼年羊组、成年羊组、老年羊组,每组 10 头羊;免疫剂量为 0.4 mg/(次·头);免疫途径和免疫程序同“1.2.1”节。

1.3 免疫羊观察与抗体监测

每天观察羊的动态,采食情况,精神状况,作好记录。每组试验羊随机抽取 5 头羊,在免疫前、二免前、三免前、五免后 5 d 分别采血并采用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay,简称 ELISA)法进行抗体检测,作好记录。

1.4 血清制备与抗体效价测定

待血液凝固之后,在超净工作台中用无菌滴管把血块剥离瓶壁,在 37℃条件下放置 1~2 h,放入 4℃冰箱过夜,血清充分析出后经离心沉淀分离出血清,放进-20℃低温冰箱保存。

抗血清效价测定采用常规的琼脂扩散方法。设定标准阳性血清孔和阴性孔,标准阳性血清孔和抗原孔之间出现明显的致密白色沉淀线,而阴性孔则不出现。

2 结果与分析

2.1 不同免疫剂量对免疫效果的影响

对 0.2、0.4、1.0 mg/(次·头)3 个免疫组,分别于免疫前、二免前、三免前、五免后检测血清中抗体效价,从表 1 可以看出,二免疫前,0.2 mg/(次·头)组抗体效价为 1:2<sup>5</sup>~1:2<sup>6</sup>,随后逐渐升高到 1:2<sup>8</sup>;0.4 mg/(次·头)组明显高于其他 2 组,五免后达到 1:2<sup>8</sup>~1:2<sup>9</sup>;而 1.0 mg/(次·头)组二免疫前略高于 0.2 mg/(次·头)组,但三免前、五免后明显低于 0.2 mg/(次·头)组。

表 1 不同免疫剂量抗体效价比较

| 免疫阶段 | 免疫剂量<br>[mg/(次·头)] | 抗体效价结果(头)        |                  |                  |                  |                  |                  |
|------|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|      |                    | 1:2 <sup>4</sup> | 1:2 <sup>5</sup> | 1:2 <sup>6</sup> | 1:2 <sup>7</sup> | 1:2 <sup>8</sup> | 1:2 <sup>9</sup> |
| 二免前  | 0.2                | —                | 6                | 4                | —                | —                | —                |
|      | 0.4                | —                | 2                | 8                | —                | —                | —                |
|      | 1.0                | —                | 4                | 6                | —                | —                | —                |
| 三免前  | 0.2                | —                | —                | 8                | 2                | —                | —                |
|      | 0.4                | —                | —                | 2                | 8                | —                | —                |
|      | 1.0                | —                | 6                | 4                | —                | —                | —                |
| 五免后  | 0.2                | —                | —                | —                | 1                | 9                | —                |
|      | 0.4                | —                | —                | —                | —                | 2                | 8                |
|      | 1.0                | —                | —                | —                | 8                | 2                | —                |

2.2 不同免疫途径对免疫效果的影响

肌肉多点、皮下多点、皮内+淋巴 3 种免疫途径的抗体产生规律见表 2,肌肉多点免疫法抗体产生效率最低,二免前大多为 1:2<sup>5</sup>,三免前大多为 1:2<sup>6</sup>,五免疫后平均达不到 1:2<sup>7</sup>;皮下多点及皮内+淋巴的方法免疫效果接近,从二免前开始抗体效价就明显高于肌肉多点组,至五免后 80% 的羊抗体效价达到了 1:2<sup>9</sup>,且皮下多点与皮内+淋巴 2 组间没有差异。

2.3 免疫羊年龄对免疫效果的影响

从表 3 可以看出,6~10 月龄的幼年羊与 28~42 月龄的老年羊免疫产生抗体的水平接近,二免前、三免前和五免后抗

体水平分别为 1:2<sup>5</sup>、1:2<sup>6</sup> 和 1:2<sup>7</sup> 左右,且组内差异较大,远不如 15~22 月龄的成年羊,二免前、三免前和五免后 15~22 月龄成年羊的抗体水平分别接近 1:2<sup>6</sup>、1:2<sup>7</sup> 和 1:2<sup>9</sup>。

3 结论与讨论

3.1 不同免疫剂量对免疫效果的影响

3 个免疫剂量以 0.4 mg/(次·头)免疫效果最好,免疫剂量过低[0.2 mg/(次·头)]与过高[1.0 mg/(次·头)]都不利于抗体的产生。通常情况下,免疫剂量太小时因刺激小不易产生免疫应答,产生抗体少,随着剂量加大,抗体水平会不断提高,但剂量大到一定程度抗体就不再继续增加。本试

表 2 不同免疫途径抗体效价比较

| 免疫阶段 | 免疫途径    | 抗体效价结果(头)          |                    |                    |                    |                    |                    |
|------|---------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|      |         | 1 : 2 <sup>4</sup> | 1 : 2 <sup>5</sup> | 1 : 2 <sup>6</sup> | 1 : 2 <sup>7</sup> | 1 : 2 <sup>8</sup> | 1 : 2 <sup>9</sup> |
| 二免前  | 肌肉多点    | 2                  | 5                  | 3                  | —                  | —                  | —                  |
|      | 皮下多点    | —                  | 2                  | 8                  | —                  | —                  | —                  |
|      | 皮内 + 淋巴 | —                  | 3                  | 7                  | —                  | —                  | —                  |
| 三免前  | 肌肉多点    | —                  | 3                  | 5                  | 2                  | —                  | —                  |
|      | 皮下多点    | —                  | —                  | 2                  | 8                  | —                  | —                  |
|      | 皮内 + 淋巴 | —                  | —                  | 3                  | 7                  | —                  | —                  |
| 五免后  | 肌肉多点    | —                  | —                  | 4                  | 4                  | 2                  | —                  |
|      | 皮下多点    | —                  | —                  | —                  | —                  | 2                  | 8                  |
|      | 皮内 + 淋巴 | —                  | —                  | —                  | —                  | 2                  | 8                  |

表 3 不同年龄免疫羊抗体效价比较

| 免疫阶段 | 免疫羊月龄<br>(月) | 抗体效价结果(头)          |                    |                    |                    |                    |                    |
|------|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|      |              | 1 : 2 <sup>4</sup> | 1 : 2 <sup>5</sup> | 1 : 2 <sup>6</sup> | 1 : 2 <sup>7</sup> | 1 : 2 <sup>8</sup> | 1 : 2 <sup>9</sup> |
| 二免前  | 6 ~ 10       | 1                  | 6                  | 3                  | —                  | —                  | —                  |
|      | 15 ~ 22      | —                  | 2                  | 8                  | —                  | —                  | —                  |
|      | 28 ~ 42      | 1                  | 7                  | 2                  | —                  | —                  | —                  |
| 三免前  | 6 ~ 10       | —                  | 2                  | 5                  | 3                  | —                  | —                  |
|      | 15 ~ 22      | —                  | —                  | 2                  | 8                  | —                  | —                  |
|      | 28 ~ 42      | —                  | 2                  | 6                  | 2                  | —                  | —                  |
| 五免后  | 6 ~ 10       | —                  | —                  | 3                  | 5                  | 2                  | —                  |
|      | 15 ~ 22      | —                  | —                  | —                  | —                  | 2                  | 8                  |
|      | 28 ~ 42      | —                  | —                  | 3                  | 6                  | 1                  | —                  |

验高剂量组出现了抗体水平反而降低的情况,是否是因为高剂量引起了“免疫耐受”或是“免疫抑制”还有待继续研究。

3.2 不同免疫途径对免疫效果的影响

3 种免疫途径中肌肉注射反应较差,皮下多点及皮内 + 淋巴 2 种途径效果一致,但皮下注射操作相对比较方便。在半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C(CYS - C)免疫试验中发现,皮内 + 淋巴的免疫方法效果明显好于皮下多点(笔者所在团队做的同期试验,尚未发表),但本试验未能有同样效果,这可能是由于 CYS - C 分子量小,皮内 + 淋巴注射能增加刺激强度,而 ApoB 分子量较大,皮下注射已达到足够的刺激强度。

3.3 免疫羊年龄对免疫效果的影响

15 ~ 22 月龄的成年羊对 ApoB 抗原的反应强度明显高于 6 ~ 10 月龄的幼年羊与 28 ~ 42 月龄的老年羊。出现这一结果的原因可能是幼年羊的免疫功能尚不健全,而老年羊的免疫功能开始退化;另外,幼年羊与老年羊组内差异较成年羊大,一方面说明幼年羊 6 ~ 10 月间免疫功能发育比较快,另一方面说明老年羊组内年龄差距太大,28 月龄羊功能接近成年羊,而 42 月龄羊功能已大幅衰退。

综上所述,本试验通过不同免疫剂量、不同免疫途径及不同羊年龄的比较,初步形成了一套以湖羊为对象的羊抗人 ApoB 高效价抗血清的免疫制备方法,效价接近 1 : 2<sup>9</sup>。但影响免疫效果的因素很多,除了抗原自身性质及本研究的因素之外,抗原的注射剂量、注射次数、间隔时间及抗原佐剂等都会对抗体效价产生影响<sup>[6-9]</sup>,要真正形成最优方法还须要对其他因素及各因素间的互作进行研究与分析。

参考文献:

[1]Uchide T, Tohya Y, Onda K, et al. Apolipoprotein B (apoB) concentrations in lipoproteins in cows[J]. The Journal of Veterinary Medical Science,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 K A, 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.

[5]Hanly W C, Artwohl J E, Bennett B T. Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry[J]. ILAR Journal, 1995,37(3):93 - 118.

[6]范 泽,刘艺娜,程镇燕,等. 饲料中添加红辣椒粉对红色草金生长、消化和免疫力的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(13):129 - 133.

[7]查满千,朱 坤,刘佳佳,等. 不同乐器演奏的轻音乐对泌乳牛免疫性能的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(15):139 - 142.

[8]邵长玲,孔军伶. 制备免疫血清免疫法改良和效果[J]. 卫生职业教育,2011,29(9):111 - 112.

[9]朱立平,陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社,2000:18 - 22.