

实验 技术

兔抗鸡 IgG-HRP 酶标抗体的制备与检测

张国中, **李春富**, 蒲娟, 赵继勋*

(中国农业大学实验动物研究所, 北京 100094)

摘要: 将经多种方法提纯的鸡 IgG 与从美国 Sigma 公司购买的纯鸡 IgG 产品进行对比研究证实, 用辛酸沉淀-50% SAS-离子交换层析方法可获得纯度很好的鸡 IgG 产物。运用该产物成功制备了兔抗鸡 IgG 抗血清以及抗鸡 IgG 重链抗血清。用辛酸沉淀-50% SAS-35% SAS 盐析提纯的兔抗鸡 IgG 与用 NaIO₄ 作用 16~20 min 的已氧化辣根过氧化物酶 (HRP) 结合 6 h, 获得了优质可靠的兔抗鸡 IgG-HRP 酶标抗体。

关键词: 兔抗鸡 IgG-HRP 酶标抗体; 鸡 IgG; 酶标记物

中图分类号: S858.31 **文献标识码:** B **文章编号:** 0529-5130 (2004)07-0016-03

酶联免疫吸附试验 (ELISA) 已广泛应用于各种畜禽疾病的诊断, 抗 IgG 的第 2 抗体已成为常用的免疫试剂之一。作为一种很好的酶标记物, 应具备标记率高、制作简便、保持活性、显色稳定的优点。目前国内尚无生产抗鸡 IgG 酶标物的厂家, 国外生产经营该试剂的公司也较少, 并且标价较高。鉴于此, 我们利用 SPF 鸡血清进行了兔抗鸡 IgG 酶结合物的制备及标记工作。

1 材料与与方法

1.1 主要仪器和材料

SPF 鸡血清由山东农业科学院家畜研究所 SPF 鸡场供;

收稿日期: 2003-10-28; 修回日期: 2003-12-31

作者简介: 张国中 (1975-), 男, 蒙古族, 讲师, 在读博士。

*通讯作者。

参照用鸡 IgG 和辣根过氧化物酶 (HRP) 购自美国 Sigma 公司; 参照用兔 IgG 采用离子交换层析法提纯; 蛋白质分子量标准购自鼎国生物公司; 免疫佐剂购自美国 Gbco 公司; DEAE 纤维素 (DE52) 购自 Whatman 公司; Sephadex-G200 购自 Pharmacia 公司; 免疫用兔由中国兽药监察所动物房培育。

1.2 鸡 IgG 的提纯及检测

辛酸-SAS 沉淀法提纯鸡 IgG, 参照文献 [1] 和 [2] 进行。将经辛酸-SAS 沉淀提纯的鸡 IgG 进行 DEAE 纤维素 (DE52) 离子交换层析, 按文献 [3] 介绍的方法分段收集样品, 以 SDS-PAGE 检测各段洗脱蛋白样品的纯度。Sephadex-G200 分子筛层析进一步提纯鸡 IgG, Sephadex-G200 的预先处理、装柱及上样等参照文献 [4] 进行, 分段收集洗脱下来的峰区样品, 电泳检测峰区内各段样品的纯度。

用 SDS-PAGE 检测提纯的鸡 IgG 样品的纯度。

损伤后的免疫功能。到第 13 天时, 2 组淋巴细胞转化率均比第 4 天增加, 组间差异消失, 提示体内细胞免疫功能的恢复。

低剂量半胱胺 (每千克体重 12.5 mg/d) 连续 3 d 灌服小鼠, 其淋巴细胞转化功能显著提高^[5]。本试验饲喂半胱胺剂量为每千克体重 13.5 mg/d 的 CT2000, 未改变手术前试验组淋巴细胞转化率, 可能免疫系统对半胱胺的应答存在种属间差异^[12]。

参考文献:

- [1] Markowska-Daniel I, Szczotka A, Bednarek D, et al. Preliminary study of the influence of plasma proteins on immunological and production parameters in pigs [J]. *Pol J Vet Sci*, 2003, 6(4): 275-277.
- [2] Langkamp-Henken B, Bender BS, Gardner EM, et al. Nutritional formula enhanced immune function and reduced days of symptoms of upper respiratory tract infection in seniors [J]. *J Am Geriatr Soc*, 2004, 52(1): 3-12.
- [3] Ikeda K, Kimura Y, Iwaya T, et al. Perioperative nutrition for gastrointestinal surgery [J]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, 2004, 105(2): 218-222.
- [4] Lin B, Kinoshita Y, Hato F, et al. Enhancement of thymic lymphocyte proliferation by the culture supernatant of thymus epithelial cells stimulated by prolactin [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 1997, 43(3): 361-367.
- [5] Bryant HU, Holaday JW, Bernton EW. Cysteamine produces dose-related bidirectional immunomodulatory effects in mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989, 249(2): 424-429.
- [6] 余贺, 谢少文. 临床免疫技术 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1982.
- [7] Stabel JR, Goff JP, Kimura K. Effects of supplemental energy on metabolic and immune measurements in periparturient dairy cows with Johne's disease [J]. *J Dairy Sci*, 2003, 86(11): 3527-3535.
- [8] 张玉华, 李树友. 断奶仔猪肠道黏膜免疫及营养 [J]. *中国饲料*, 2002, (1): 31-32.
- [9] Lennard TW, Shenton Bk, Borzotta A, et al. The influence of surgical operations on components of the human immune system [J]. *Br J Surg*, 1985, (72): 771-776.
- [10] Ogawa K, Hirai M, Katsube T, et al. Suppression of cellular immunity by surgical stress [J]. *Surgery*, 2000, 127(6): 613.
- [11] 陈强谱, 邢月利, 欧琨, 等. 早期肠内营养对胃肠癌患者术后 T 淋巴细胞亚群的影响 [J]. *癌症*, 2001, 20(3): 294-297.
- [12] 吕学选, 王朝辉. 生物的防卫功能 [J]. *黑龙江医药科学*, 2003, 26(5): 1-3.

1.3 兔抗鸡 IgG 抗血清的制备及标准

1.3.1 鸡 IgG 重链抗血清的制备 将经离子交换层析提纯的鸡 IgG 进行 SDS-PAGE。电泳后切割重链部分凝胶条，经无菌处理加入等体积的弗氏佐剂乳化，常规方法免疫制备抗血清。

1.3.2 兔抗鸡 IgG 抗血清的制备 过离子交换层析后又经分子筛层析提纯的鸡 IgG 同样按常规方法免疫家兔，制备兔抗鸡 IgG 抗血清。

1.3.3 兔抗鸡 IgG 的提纯 方法如鸡 IgG 的提纯。分别进行辛酸-50% SAS-35% SAS 盐析以及过 DEAE 纤维素 (DE52) 离子交换层析柱提纯兔抗鸡 IgG。经 SDS-PAGE 检测比较 2 种方法提纯物的纯度。

1.4 兔抗鸡 IgG HRP 酶标抗体的制备

参照文献 [5] 进行。制备得到的酶标抗体用分光光度计测定酶结合物溶液，计算酶与抗体的克分子比值。

1.5 自制酶标抗体的质量检测

将鸡抗 Yucaipa 病毒阳性血清作从 2^{-7} 至 2^{-12} 的倍比稀释，通过在 Dot-ELISA 中的显色效果判定自制酶标抗体的质量。

1.6 2 种自制酶标抗体的应用效果比较

Yucaipa 鸡胚尿囊毒从 2^{-1} 倍比稀释至 2^{-16} ，正常 SPF 鸡胚混合尿囊液从 2^{-1} 倍比稀释至 2^{-7} 。Dot-ELISA 方法测试鸡 IgG 重链免疫与鸡 IgG 全分子免疫产生并制备的兔抗鸡 IgG HRP 酶标抗体 (前者最适工作浓度为 1/200，后者为 1/1 000) 在检测 Yucaipa 鸡胚尿囊液毒时的非特异性反应情况。

2 结果与分析

2.1 鸡 IgG 的提纯

由图 1 可以看出，经 SDS-PAGE 检测发现其中仍含有较多的杂蛋白未能去除，而再经 33% 或 35% SAS 处理仅能去除其中的部分杂蛋白。

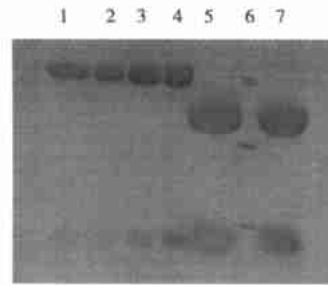


注：1. 辛酸-50% SAS-35% SAS 提纯鸡 IgG；
2. 蛋白质分子量标准；
3. 辛酸-50% SAS 提纯鸡 IgG；
4. 辛酸-50% SAS-35% SAS 提纯鸡 IgG

图 1 辛酸-SAS 二步法与辛酸-SAS 三步法提纯鸡 IgG 的比较

由图 2 可以看出，经辛酸-SAS 提纯的鸡 IgG 再过 DEAE 纤维素 (DE52) 离子交换层析柱后的鸡 IgG 相对较纯。经 Sephadex-200 分子筛层析未能提高将经离子交换层析提纯所得鸡 IgG 的纯度。经离子交换层析提纯的鸡 IgG 再经 20% SAS 盐析仍不能产生任何良好的效果。通过与美国进口 (Sigma 公司产品) 的经分级沉淀及离子交换层析提纯的鸡 IgG 的 SDS-

PAGE 结果比较显示，本试验提纯的鸡 IgG 的纯度不次于进口产品。



注：1. 辛酸-SAS-离子交换层析提纯鸡 IgG；
2. 辛酸-SAS-离子交换层析-20% SAS 提纯鸡 IgG；
3. 辛酸-SAS-离子交换层析-Sephadex-C200 提纯鸡 IgG；
4. 美国 Sigma 公司鸡 IgG；
5. SAS 分级沉淀-离子交换层析提纯兔 IgG；
6. 蛋白质分子量标准；
7. SAS 分级沉淀-离子交换层析提纯兔 IgG

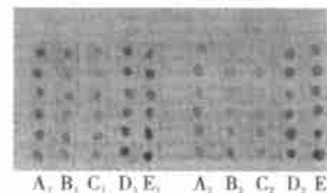
图 2 提纯鸡 IgG 与提纯兔 IgG 的比较

2.2 兔抗鸡 IgG 的提纯

离子交换层析提纯所得兔 IgG 的纯度明显好于辛酸-SAS 沉淀法提纯得到的兔 IgG，这与提纯鸡 IgG 时的情况相同。

2.3 兔抗鸡 IgG HRP 标记试验

2.3.1 不同 HRP/ IgG 克分子比值对酶标抗体质量的影响 将用鸡 IgG 全分子免疫制得的兔抗鸡 IgG 经离子交换层析提纯后，制备兔抗鸡 IgG HRP 酶标抗体。通过调整不同 HRP/ IgG 克分子比值获得 5 组酶标抗体，它们的 HRP/ IgG 克分子比值分别为 4.15、3.24、2.49、1.99 和 2.43。不同 HRP/ IgG 克分子比值酶标抗体的显色情况见图 3。



注：1) 酶标抗体 HRP/ IgG 克分子比值 A 为 4.15，B 为 3.24，C 为 2.49，D 为 1.99，E 为 2.43。
2) 酶标抗体的稀释度 A₁ ~ E₁ 为 1400；A₂ ~ E₂ 为 1800

图 3 不同参数的自制兔抗鸡 IgG HRP 酶标抗体在 Dot-ELISA 中的显色情况

可以看出，HRP/ IgG 克分子比值不同对显色效果的影响并不呈必然的规律性变化。有的酶标抗体 HRP/ IgG 克分子比值很大，显色效果却很好。

2.3.2 标记过程中 HRP 与 NaIO₄ 作用时间对酶标抗体质量的影响 由表 1 可以看出，HRP 与 NaIO₄ 作用时间为 20 min 和 16 min 时，所标记出的酶标抗体的显色效果明显好于作用 30 min 的效果。

表 1 HRP 与 NaIO₄ 作用时间不同对酶标抗体质量的影响

HRP 与 NaIO ₄ 的作用时间 t/min	HRP/IgG 克分子比值	HRP 与兔抗鸡 IgG 的结合时间 t/h	鸡抗 Yucaipa 病毒阳性血清的点样稀释度					
			2 ⁻⁷	2 ⁻⁸	2 ⁻⁹	2 ⁻¹⁰	2 ⁻¹¹	2 ⁻¹²
16	1.99	6	#	#	##	##	##	##
20	2.43	12	#	#	#	##	##	##
30	2.49	6	##	+	+	+	+	+

注：表中符号 #、##、###、+、±、- 表示斑点颜色由深到浅再到无的变化程度。

2.3.3 辛酸-SAS 沉淀法和离子交换层析法提纯的兔抗鸡 IgG 经同一过程酶标后的比较 根据表 2 可以看出，经辛酸-SAS 沉淀提纯的兔抗鸡 IgG 虽然在纯度上较经离子交换层析提纯的兔抗鸡 IgG 为差，但是由二者制备酶标抗体的质量却无明显差别。

表 2 2 种方法提纯的兔抗鸡 IgG 制备的酶标抗体的 Dot-ELISA 比较

提纯方式	鸡抗 Yucaipa 病毒阳性血清的点样稀释度					
	2 ⁻⁷	2 ⁻⁸	2 ⁻⁹	2 ⁻¹⁰	2 ⁻¹¹	2 ⁻¹²
辛酸-SAS 沉淀法提纯	#	#	##	##	##	##
离子交换层析法提纯	#	#	#	##	##	##

2.3.4 鸡 IgG 重链免疫和鸡 IgG 全分子免疫产生并制备的兔抗鸡 IgG HRP 酶标抗体的显色效果比较 从表 3 结果可以看出，用鸡 IgG 重链免疫产生的兔抗鸡 IgG 制得的酶标抗体的显色效果，明显差于用鸡 IgG 全分子免疫产生的兔抗鸡 IgG 制得的酶标抗体。

表 3 鸡 IgG 重链分子和鸡 IgG 全分子免疫制备酶标抗体的 Dot-ELISA 比较

免疫原	HRP/IgG 克分子比	酶标抗体中 IgG 含量 /mg·mL ⁻¹	酶标抗体的稀释倍数				
			1/100	1/200	1/400	1/800	1/2 000
鸡 IgG 全分子	1.992	0.071	—	—	#	##	##
鸡 IgG 重链	1.68	0.071	##	+	+	+	—

注：“—”表示未做此项测试。

2.3.5 用鸡 IgG 重链免疫与鸡 IgG 全分子免疫产生并制备的兔抗鸡 IgG HRP 酶标抗体在 Dot-ELISA 间接法检测 Yucaipa 鸡胚尿囊毒中的应用效果比较 测试结果表明，鸡 IgG 重链免疫与鸡 IgG 全分子免疫产生并制备的兔抗鸡 IgG HRP 酶标抗体，在检测 Yucaipa 尿囊液毒时的非特异性斑点产生情况基本一致，从而说明鸡 IgG 重链免疫产生并制备的兔抗鸡 IgG HRP 酶标抗体并不能解决检测 Yucaipa 鸡胚尿囊液毒时存在的非特异性反应问题。

3 讨论

本试验所用辛酸-SAS 提纯鸡 IgG 的方法是综合文献 [1] 和 [2] 中进行的。文献 [1] 是用辛酸-SAS 二步法从小鼠腹水中提取单抗 IgG；文献 [2] 是将辛酸沉淀与 DEAE 纤维素 (DE52) 离子交换层析结合起来，从人血清中提取 IgG。其中 DEAE 纤维素 (DE52) 吸附去除杂蛋白的条件是 pH 5.7，这与其他文献^[4,7-9]所介绍的离子交换洗脱 IgG 的 pH 值条件 (6.7~7.4) 相差较大。因此在提纯鸡 IgG 的过程中本试验只是参考了文献 [2] 中的辛酸用量，其他步骤主要按文献 [1] 进行。SDS-PAGE 检测发现辛酸-50% SAS 提纯鸡 IgG 的纯度离免疫要求还相差很远，这与文献 [1] 中的报道不同。后者用该法从小鼠腹水中提得的单抗 IgG 的纯度在 SDS-PAGE 照片中显示很好，二者差别是否由提纯原料不同造成值得进一步探讨。

我们的研究表明，经辛酸-SAS 提纯的鸡 IgG (或兔抗鸡 IgG) 再经 DEAE 纤维素 (DE52) 离子交换层析提纯后纯度相对较高，可以满足一些基本实验需要，如作为实验参照品、制备酶 (或荧光) 标记抗体等。

本试验按文献 [5] 所介绍的 HRP 与 NaIO₄ 的作用时间 (30 min) 处理时效果欠佳。作用 30 min 的兔抗鸡 IgG HRP 的质量远远不及作用 20 min 与作用 16 min 的质量。此差别也可能由所用试剂的质量或其他方面原因造成，因此希望从事有关方面工作的科研人员注意其时间的选择和确定。

本研究制备的兔抗鸡-HRP 酶标抗体连续 6 年经中国农业大学、北京市农林科学院、中国农业科学院等多家单位的应用表明，该酶标抗体优质、稳定、可靠，完全可以满足科研和检测需要。

参考文献：

- [1] 叶群瑞. 一种简单、快速、量大的辛酸纯化单克隆抗体法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18 (1): 60-62.
- [2] 李希强. 一种简单可较大量提取血清 IgG 的方法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18 (3): 214-218.
- [3] 孙刚, 李海山, 林洪强, 等. 一种快速提纯兔抗鸡 EDS-76 病毒 IgG 的方法 [J]. 中国畜禽传染病, 1998, 20(3): 159-160.
- [4] 周顺伍. 生物化学实验技术 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1989. 1-10, 23-24, 96-101
- [5] 郭春祥, 郭锡琼. 介绍一种简单、快速高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法 [J]. 上海免疫学杂志, 1993, 3 (2): 97-100.
- [6] 曹澍泽, 郭玉璞, 董国雄, 等. 兽医微生物学及免疫学技术 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1991. 332-339.
- [7] 刘玉斌, 苟仕金. 动物免疫学技术 [M]. 吉林: 吉林科学技术出版社, 1989. 1-23.
- [8] 陈竞新, 唐立君, 张立新, 等. 羊抗人 IgG 的纯化及其在抗 HCV 检测中的应用 [J]. 生物技术通讯, 2001, 12(2): 109-111.
- [9] 孙建宏, 曹殿军, 刘培欣, 等. 从血清中分离纯化鸡 IgG、IgM 的实用方法 [J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22(5): 278-280.