

十六种鸟类二级抗体的制备和辣根过氧化物酶标记

林树柱 杨帆,刘先菊,张连峰

(中国医学科学院,北京协和医学院,医学实验动物研究所,卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 制备兔抗16种鸟类的二级抗体,并进行辣根过氧化物酶标记,为鸟类血清学检测系统的建立提供工具。方法 采用水稀释法粗纯抗体后,再利用改良的饱和硫酸铵分级沉淀法,或亲和层析结合饱和硫酸铵沉淀法,或饱和硫酸铵沉淀法结合 SDS-PAGE 凝胶切胶纯化的方法进一步纯化鸟类的 IgY,利用纯化的 IgY 免疫大耳白兔制备抗血清,用免疫双扩散来检测抗血清的效价,并用 Protein A 亲和层析的方法来纯化兔抗鸟类的二级抗体,采用简易过碘酸钠法对纯化的兔抗鸟类的二级抗体进行辣根过氧化物酶标记,通过 ELISA 方法测定标记抗体的效价,并利用 Western blots 考察标记抗体的特异性。结果 纯化了灰雁、鸬鹚、鸵鸟、小鸬鹚、鸽子、鹅、孔雀、鹌鹑、贵妃鸡、草鹭、夜鹭、赤嘴潜鸭、燕鸥、长脚鹬、虎皮鹌鹑、翘鼻麻鸭等 16 种鸟类的 IgY,免疫双扩散法测定兔抗这 16 种鸟类的抗血清效价均达到 1:32,并对纯化的兔抗灰雁 IgY、兔抗鸬鹚 IgY、兔抗鸵鸟 IgY、兔抗小鸬鹚 IgY、兔抗鸽子 IgY、兔抗鹅 IgY、兔抗孔雀 IgY、兔抗鹌鹑 IgY、兔抗贵妃鸡 IgY、兔抗草鹭 IgY、兔抗夜鹭 IgY、兔抗赤嘴潜鸭 IgY、兔抗燕鸥 IgY、兔抗长脚鹬 IgY、兔抗虎皮鹌鹑 IgY、兔抗翘鼻麻鸭 IgY 等 16 种兔抗鸟类 IgY 的二级抗体进行了辣根过氧化物酶标记,ELISA 测定标记抗体的效价达到 1:800~80000 左右,Western blots 显示标记抗体具有很好的特异性。结论 成功制备了辣根过氧化物酶标记的兔抗 16 种鸟类的二级抗体,为鸟类血清学检测体系的建立提供了工具。

【关键词】 鸟类; IgY; 二级抗体; 辣根过氧化物酶

【中图分类号】 R392; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)06-0001-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.06.001

Preparation and HRP Labeling of Rabbit Polyclonal Antibodies against Sixteen Birds

LIN Shu-zhu, YANG fan, LIU Xian-ju, ZHANG Lian-feng

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Human Disease Animal Models Level-3 Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To prepare the rabbit polyclonal antibodies against sixteen stains of birds, and to label the secondary antibodies with horseradish peroxidase for developing the serological test system of birds. **Methods** IgYs of birds were purified by water diluted, combining precipitation with ammonium sulfate, or affinity chromatography and precipitation with ammonium sulfate, or precipitation with ammonium sulfate and cutting the SDS-PAGE gel slices that contain the IgY bands. Rabbit anti-sera were prepared by repeatedly immunized rabbits with purified IgYs. The antibodies against bird IgY

[基金项目] 社会公益研究专项(2005DIA1J095)。

[作者简介] 林树柱,女,助理研究员;研究领域:微生物学。E-mail: shuzhulin@hotmail.com。

[通讯作者] 张连峰。E-mail: zhanglianfeng@cnilas.pumc.edu.cn。

in rabbit sera were detected by agarose double immunodiffusion and purified using Protein A affinity chromatography. The products were labeled using HRP by periodate oxidation method. And the activities of the labeled rabbit polyclonal antibodies against sixteen strains of birds were detected by ELISA. Western blots were performed to investigate the specificity of IgG-HRP against the IgY of birds. **Results** The IgYs from the strains of birds were purified, including greylag goose, great cormorant, ostrich, little grebe, pigeon, rich bird, goose, peacock, quail, ladyhood-chicken, heron, night-heron, red-crested pochard, tern, black-winged stilt, parrots, common shelduck. The titers of sixteen rabbit anti-sera were up to 1:32 examined by agarose double immunodiffusion. Sixteen kinds of purified rabbit anti-bird secondary antibodies were labeled with HRP and their activities were up to 1:800-80000 examined by ELISA. The specific activities of the sixteen rabbit anti-bird IgGs-HRP were indicated with western blot. **Conclusions** Rabbit polyclonal antibodies against sixteen birds labeled with HRP were prepared successfully; It was an useful tool for developing the serological test system for birds.

【Key words】 Bird; IgY; Secondary antibody; HRP

鸟纲是动物种类最多的一个纲,世界上现存的鸟类有近 9000 种。鸟类与人类的关系也极为密切,有些鸟类作为宠物被人类豢养在家中,有些作为经济鸟类被大规模饲养,还有些鸟类是珍惜保护动物。鸟类的疫病常常会引起鸟的大量死亡,而且有些疫病甚至会传染给人类,因此对鸟类疫病进行监测,对保障国民经济发展与人类健康具有重要意义。血清学检测是动物病原检疫的重要手段,而标记的动物二级抗体是建立血清学检测技术的重要工具。但是世界范围内都缺乏标记的抗鸟类的二级抗体,为此本研究分离纯化了灰雁、鸬鹚、鸵鸟、小鸬鹚、鸽子、鹅、孔雀、鹌鹑、贵妃鸡、草鹭、夜鹭、赤嘴潜鸭、燕鸥、长脚鹬、虎皮鸬鹚、翘鼻麻鸭等 16 种禽类的 IgY,免疫大耳白兔制备了兔抗这些鸟类的二级抗体,并用辣根过氧化物酶(HRP)对制备的二级抗体进行了标记,为鸟类血清学检测体系的建立提供了工具。

1 材料和方法

1.1 16 种鸟类 IgY 的分离纯化

取灰雁、鸬鹚、鸵鸟、小鸬鹚、鸽子、鹅、孔雀、鹌鹑、贵妃鸡、草鹭、夜鹭、赤嘴潜鸭、燕鸥、长脚鹬、虎皮鸬鹚、翘鼻麻鸭等 16 种禽类的卵黄液,参照文献[1]采用水稀释法除去卵黄中的脂类,-80℃保存备用。

灰雁、鸬鹚、鸵鸟、小鸬鹚、鸽子、鹅的去脂卵黄液采用改良的硫酸铵分级沉淀法进一步纯化 IgY^[2]。取去脂的卵黄液 5 mL/份(4 份),加入等体积的 PBS(0.01 mol/L pH 7.4)稀释。加 pH 7.0 的饱和硫酸铵分别至终浓度为 30%,40%,50%,60%。4℃静置 4 h,以 5000 r/min 离心 25 min,弃上清,取沉淀,沉淀溶于原来体积的 PBS 中。再加饱

和硫酸铵分别至 20%,30%,40%,50% 等不同饱和度和。4℃静置过夜,次日 4℃,5000 rpm 离心 20 min。弃上清,沉淀稀释于 5 mL 的 PBS 中。4℃透析于 PBS 中 24 h,更换 4 次透析液,SDS-PAGE 电泳检测纯化 IgY 的分布和纯度。

孔雀、鹌鹑、贵妃鸡、草鹭、夜鹭去脂的卵黄液,采用亲和层析和饱和硫酸铵沉淀的方法进一步纯化 IgY,去脂卵黄液稀释后过 Hitrap IgY Purification HP 亲和柱,亲和产物再利用饱和硫酸铵进一步沉淀。具体纯化方法参照文献^[1]进行。

赤嘴潜鸭、燕鸥、长脚鹬、虎皮鸬鹚、翘鼻麻鸭 IgY 通过切胶的方法进行纯化^[3]。去脂卵黄液经饱和硫酸铵沉淀,得到 IgY 的粗提液,再将粗提液在 12% 的 SDS-PAGE 上分离,电泳完毕后,小心将胶取下,从中间和两侧分别纵向切下三个条带,宽度约 0.5 mm。取下凝胶,切下的胶条常规考马斯亮蓝 R-250 染色法染色 15 min。再置脱色液中脱色至条带清晰可见。将胶条复位,对照染过色的胶条的目的条带,用刀片切下未染色部分的凝胶相应位置的目的条带,加生理盐水将胶条研碎,备免疫用。

1.2 兔抗 16 种鸟类抗血清的制备及二级抗体 IgG 的纯化

利用纯化的 16 种鸟类 IgY 免疫大耳白兔,制备兔抗这 16 种鸟类一级抗体的抗血清,具体方法参照文献进行^[4]。抗血清效价用琼脂糖凝胶免疫双扩散方法进行测定^[5]。2.5 mL 兔抗血清用 10 mL PBS (20 mmol/L, pH 7.0) 稀释,0.45 μm 膜过滤,利用 GE 公司 HiTrap Protein A HP 5 mL 的预装柱进行亲和层析^[6],纯度都经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。

1.3 兔抗 16 种鸟类二级抗体的 HRP 标记和标记

抗体 ELISA 工作浓度测定

兔抗 16 种鸟类二级抗体的 HRP 标记采用过碘酸钠法,具体操作参照文献进行^[3,7]。

用直接 ELISA 法测定标记抗体的工作浓度,利用非切胶纯化的 11 种鸟类的 IgY 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.1 mL/孔包被 ELISA 板,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日洗涤、封闭,相应的酶标记抗体用 1% BSA-PBS 液梯度稀释,分别加入反应孔中,每个稀释度二孔,每孔 0.1 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后洗涤 3 次,3 min/次。于各反应孔中加入临时配制的 TMB 底物溶液 0.1 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min。以 2 mol/L H_2SO_4 终止反应。用 ELISA 比色仪双波长 450 nm/630 nm 读取各孔 A 值。取 A 值为 1.0 左右的酶标抗体稀释度作为标记抗体的 ELISA 工作浓度^[3]。

1.4 Western blotting 方法检测标记抗体

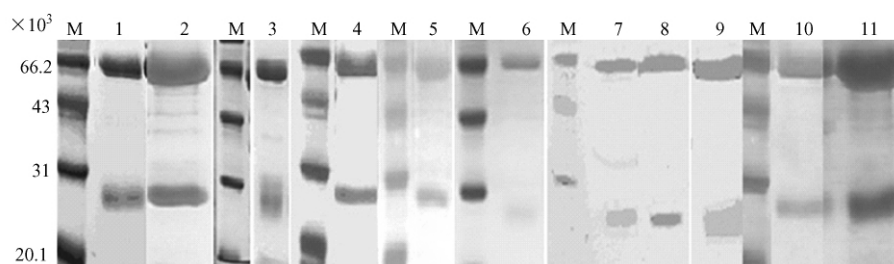


图 1 纯化的鸟类 IgY 的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the purified bird IgY

注: M: 蛋白分子量 marker; 1. 灰雁 IgY; 2. 鸬鹚 IgY; 3. 鸵鸟 IgY; 4. 小鸊鹈 IgY; 5. 鸽子 IgY; 6. 鹅 IgY; 7. 孔雀 IgY; 8. 鹌鹑 IgY; 9. 贵妃鸡 IgY; 10. 草鹭 IgY; 11. 夜鹭 IgY

Note: M: standard protein marker; 1: greylag goose IgY; 2: great cormorant IgY; 3: ostrich IgY; 4: little grebe IgY;

5: pigeon IgY; 6: goose IgY; 7: peacock IgY; 8: quail IgY; 9: ladyhood-chicken IgY; 10: heron IgY; 11: night-heron IgY

2.2 Protein A 纯化兔抗 16 种鸟类的二级抗体

用纯化的灰雁、鸬鹚、鸵鸟、小鸊鹈、鸽子、鹅、孔雀、鹌鹑、贵妃鸡、草鹭、夜鹭、赤嘴潜鸭、燕鸥、长脚鹬、虎皮鸚鵡、翘鼻麻鸭等 16 种鸟类的 IgY 分别免疫大耳白兔 4 次后,利用琼脂糖凝胶免疫双扩散的方法检测抗血清效价达到 1:32 以上,取血,制备抗血清,每只兔子得抗血清 50 mL 左右。

通过 Protein A 亲和层析纯化兔抗 16 种鸟类抗血清中的 IgG,经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后发现在还原条件下呈现清晰的重链和轻链两条带,几乎没有其他杂带。电泳图未给出。

2.3 ELISA 方法鉴定 HRP 标记抗体的效价

采用过碘酸钠法对兔抗 16 种鸟类 IgY 的二级抗体进行了 HRP 标记,并用 ELISA 方法对其中 11 种标记二级抗体的效价进行了分析。以 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 鸟类的 IgY 包被 ELISA 板,0.1 mL/孔,相应的酶标

16 种去脂的卵黄液利用 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,湿法转移至 NC 膜上,封闭后分别与相应的适当稀释的标记二级抗体进行孵育,室温 1 h, TBST 洗膜 3 次,10 min/次, TBS 洗膜 10 min,与底物反应后曝光。

2 结果

2.1 纯化 16 种鸟类卵黄抗体 IgY

利用水稀释法、改良的饱和硫酸铵分级沉淀法、亲和层析或 SDS-PAGE 凝胶切胶纯化的方法纯化了灰雁、鸬鹚、鸵鸟、小鸊鹈、鸽子、鹅、孔雀、鹌鹑、贵妃鸡、草鹭、夜鹭、赤嘴潜鸭、燕鸥、长脚鹬、虎皮鸚鵡、翘鼻麻鸭等 16 种禽类的 IgY,11 种非切胶纯化的禽类 IgY 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后发现其纯度达到了免疫的要求(图 1)

记抗体用 1% BSA-PBST 进行系列稀释,每个稀释度二孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后洗涤 3 次。于各反应孔中加入临时配制的 TMB 底物溶液 0.1 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min。以 2 mol/L H_2SO_4 终止反应。在 ELISA 比色仪上采用 450 nm/630 nm 双波长读取各孔 A 值。取 A 值为 1.0 左右的酶标抗体稀释度作为标记抗体的 ELISA 工作浓度。结果如表 1 所示。

2.4 Western blotting 方法检测标记抗体

16 种去脂的卵黄液利用 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,湿法转移至 NC 膜上,封闭后分别与相应适当稀释的标记二级抗体进行孵育,室温 1 h, TBST 洗膜 3 次,10 min/次, TBS 洗膜 10 min,与底物反应后曝光,结果显示标记抗体具有很好的特异性。标记二级抗体的稀释倍数分别为:HRP 标记的兔抗虎皮鸚鵡 IgY 的二级抗体 1:200;HRP 标记的兔抗灰雁、小鸊鹈、鸽子、鹌鹑、草鹭、夜鹭、燕鸥

IgY 的二级抗体 1:500; HRP 标记的兔抗赤嘴潜鸭、翘鼻麻鸭、长脚鹬 IgY 的二级抗体 1:1000; HRP 标记的兔抗鹅、贵妃鸡 IgY 的二级抗体 1:2000; HRP

标记的兔抗鸬鹚、鸵鸟 IgY 的二级抗 1:3000; HRP 标记的兔抗孔雀 IgY 的二级抗体 1:30000。Western blotting 结果如图 2。

表 1 ELISA 方法检测 HRP 标记的抗体效价
Tab. 1 Determination of the titers of the IgG-HRP by ELISA

二级抗体 Rabbit polyclonal antibodies against bird IgY	ELISA 工作浓度 ELISA working dilutions	二级抗体 Rabbit polyclonal antibodies against bird IgY	ELISA 工作浓度 ELISA working dilutions
兔抗灰雁 IgY Anti-greylag goose IgY	1:1000	兔抗鸬鹚 IgY Anti-great cormorant IgY	1:10000
兔抗鸵鸟 IgY Anti-ostrich IgY	1:10000	兔抗小鸬鹚 IgY Anti-little grebe IgY	1:1000
兔抗鸽子 IgY Anti-pigeon IgY	1:1000	兔抗夜鹭 IgY Anti-night-heron IgY	1:1000
兔抗鹅 IgY Anti-goose IgY	1:5000	兔抗孔雀 IgY Anti-peacock IgY	1:80000
兔抗鹌鹑 IgY Anti-quail IgY	1:800	兔抗贵妃鸡 IgY Anti-ladyhood-chicken IgY	1:6000
兔抗草鹭 IgY Anti-heron IgY	1:1000		

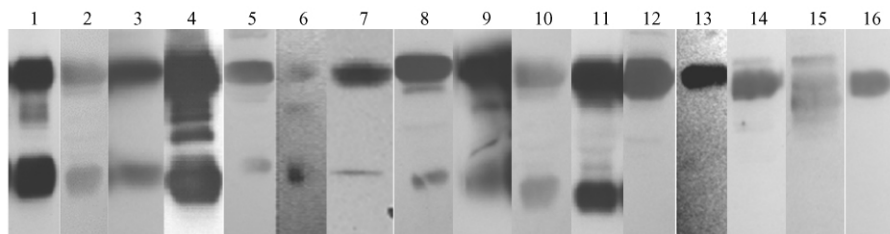


图 2 Western blot 检测酶标抗体的特异性

Fig. 2 Determination of the specificity of rabbit IgG-HRP against the birds IgY with Western blot

注: 1. 灰雁; 2. 鸬鹚; 3. 鸵鸟; 4. 小鸬鹚; 5. 鸽子; 6. 鹅; 7. 孔雀; 8. 鹌鹑; 9. 贵妃鸡; 10. 草鹭;

11. 夜鹭; 12. 赤嘴潜鸭; 13. 燕鸥; 14. 长脚鹬; 15. 虎皮鹦鹉; 16. 翘鼻麻鸭

Note: 1: greylag goose IgY; 2: great cormorant IgY; 3: ostrich IgY; 4: little grebe IgY; 5: pigeon IgY; 6: goose IgY; 7: peacock IgY; 8: quail IgY; 9: ladyhood-chicken IgY; 10: heron IgY; 11: night-heron IgY; 12: red-crested pochard; 13: tern; 14: black-winged stilt; 15: parrots; 16: common shelduck

3 讨论

卵黄抗体 IgY 是鸟类的主要抗体,其在卵成熟过程中从血清传递到卵黄中, IgY 在卵黄中的含量超过其在血清中的含量^[4]。本文建立了多种鸟类 IgY 纯化的方法,通过水稀释去脂、改良饱和硫酸铵沉淀、亲和层析、切胶回收等方法,纯化了灰雁、鸬鹚、鸵鸟、小鸬鹚、鸽子、鹅、孔雀、鹌鹑、贵妃鸡、草鹭、夜鹭、赤嘴潜鸭、燕鸥、长脚鹬、虎皮鹦鹉、翘鼻麻鸭等 16 种鸟类的 IgY。免疫大耳白兔制备了兔抗这些鸟类的二级抗体,并用辣根过氧化物酶 (HRP) 对制备的二级抗体进行了标记,结合之前制备的 HRP 标记的兔抗麻雀二级抗体,本项研究共建立了 18 种鸟类的血清学检测系统。这 18 种鸟类中有鹦鹉等在家庭中广泛豢养的鸟类,也有鹅、鸽子等大规模饲养的经济鸟类,还有孔雀等观赏鸟类,既有灰雁等长距离迁徙的鸟类,也有麻雀等生活在人类周围的留鸟,这个标记鸟类抗体库的建立部分

的解决了动物病原和新发传染病病原学清学检测系统不完备的问题,为鸟类疫病的监测和控制提供了有效的工具。

鸟类是与人类关系极为密切,其作为宠物生活在人类家庭中,与人类日常生活关系密切,作为经济动物又是人类经济生活的重要组成部分,鸟类还是人类食物的重要来源。鸟类疫病常常会引起鸟类的大量死亡,同时也会给人类的健康带来威胁。鸟类传播的人兽共患病多数为无临床症状或自限性的,但偶尔也会出现严重疾病。而且鸟类的活动范围较大,尤其是迁徙鸟类,这种远距离的迁徙,增加了病原微生物扩散的风险,易导致爆发大范围的感染性疾病。例如高致病性禽流感至今已蔓延了全球多个国家,数以百万的禽类死亡,同时也引起感染病人的死亡。与鸟类相关病原体的有: 鹦鹉热, 禽流感、组织胞浆菌病、新城疫等; 引起胃肠系统症状的有: 沙门氏菌感染、弯曲杆菌病、贾第鞭毛虫病等; 引起皮肤症状

的有:丹毒丝菌病及一些由鸟类传播的皮肤病等^[8-11]。因此建立有效的鸟类病原检测技术,控制鸟类疫病的发生,对保障人类的健康和社会的发展具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 杨帆,刘先菊,林树柱,等. 三种鸡形目雉科禽类卵黄抗体的纯化及二抗的制备[J]. 中国比较医学杂志,2007,17(11):652-655.
- [2] 杨帆,林树柱,刘先菊,等. 鸮科和鸬鹚科卵黄抗体的纯化[J]. 中国比较医学杂志,2007,17(11):659-661.
- [3] 杨帆,刘先菊,林树柱,等. 兔抗麻雀 IgY 酶标抗体的制备[J]. 中国比较医学杂志,2008,18(5):41-44.
- [4] 杨帆,刘先菊,林树柱,等. 改良的硫酸铵沉淀法纯化大雁的卵黄抗体[J]. 中国比较医学杂志,2007,17(11):625-628.
- [5] 林树柱,李万波,刘先菊,等. 乌鳢血清免疫球蛋白 IgM 的分离纯化及其兔抗血清的制备[J]. 中国比较医学杂志,2007,17(11):648-651.
- [6] 林树柱,李万波,刘先菊,等. 兔抗五种鱼免疫球蛋白抗体的制备和 HRP 标记[J]. 中国比较医学杂志,2008,18(5):45-49.
- [7] 金伯泉,李恩善. 医学基础免疫学实验指导(第1版)[M]. 北京:世界图书出版社,1990.
- [8] Keels SJ, Kristine MT, Jan ML, et al. Polly can make you sick: Pet bird - associated diseases [J]. Cleveland clinic journal of medicine, 2009, 76(4): 235-243.
- [9] Andersen AA, Vanrompay D. Avian chlamydiosis [J]. Rev Sci Tech., 2000, 19(2): 396-404.
- [10] Harris JM. Zoonotic diseases of birds [J]. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1991, 21(6):1289-1298.
- [11] 林树柱,张连峰. 宠物对人类健康的潜在威胁[J]. 中国比较医学杂志,2010,20(4):80-86.

(修回日期)2010-11-10