

十七种哺乳动物二级抗体的制备和辣根过氧化物酶标记

林树柱, 刘先菊, 杨帆, 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 17 种哺乳动物的二级抗体, 并进行辣根过氧化物酶标记, 为哺乳血清学检测系统的建立提供工具。方法 利用饱和硫酸铵沉淀法粗纯抗体后, 再利用 protein A 或 protein G 亲和层析的方法进一步纯化哺乳动物的 IgG, 免疫大耳白兔制备抗血清, 利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哺乳动物的二级抗体, 采用简易过碘酸钠法对纯化的兔抗哺乳动物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 blot 方法考察标记抗体的特异性。结果 纯化了恒河猴、东北虎、布氏田鼠、黑线姬鼠、斑羚、原驼、果子狸、食蟹猴、梅花鹿、长爪沙鼠、马鹿、骆驼、大仓鼠、豚鹿、熊猴、大耳羊和雪貂等 17 种哺乳动物的血清 IgG, 分别免疫大耳白兔制备了这 17 种哺乳动物的兔抗血清, 免疫双扩散法测定兔抗这 17 种哺乳动物的抗血清效价均达到 1:32, 并对纯化的兔抗恒河猴 IgG、兔抗东北虎 IgG、兔抗布氏田鼠 IgG、兔抗黑线姬鼠 IgG、兔抗斑羚 IgG、兔抗原驼 IgG、兔抗果子狸 IgG、兔抗食蟹猴 IgG、兔抗梅花鹿 IgG、兔抗长爪沙鼠 IgG、兔抗马鹿 IgG、兔抗骆驼 IgG、兔抗大仓鼠 IgG、兔抗豚鹿 IgG、兔抗熊猴 IgG、兔抗大耳羊 IgG 和兔抗雪貂 IgG 等 17 种哺乳动物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:(2000~60000) 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 HRP 标记的兔抗 17 种哺乳动物的二级抗体, 为哺乳动物血清学检测体系的建立提供了工具。

【关键词】 哺乳动物; 二级抗体; 辣根过氧化物酶; 标记

【中图分类号】 R392 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)07-0001-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.07.001

Preparation and HRP Labeling of Rabbit Polyclonal Antibodies against Seventeen Mammals

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

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences;
Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Beijing Union Medicine College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To prepare the rabbit polyclonal antibodies against seventeen mammals and to label the secondary antibodies with horseradish peroxidase for developing the serological test system of mammals. **Methods** IgGs of mammals were purified by precipitation with ammonium sulfate combining affinity chromatography using Protein A or Protein

[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。

G. Rabbit anti-sera were prepared by repeatedly immunized rabbits with purified IgGs. The antibodies against mammal IgG 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 seventeen mammals were detected by ELISA. Western blots were performed to investigate the specificity of the seventeen rabbit anti-mammal IgGs-HRP. **Results** The IgGs from the seventeen mammal species were purified, including rhesus, tiger, brandt's vole, striped hamster, goral, guanaco, civet cat, crab-eating macaque, sika deer, mongolian gerbil, red deer, camel, hog deer, ibex, hamster, assam macaque, ferret. The titers of seventeen rabbit anti-sera were up to 1:32 examined by agarose double immunodiffusion. Seventeen kinds of purified rabbit anti-mammal secondary antibodies were labeled with HRP and their activities were up to 1:2000-60000 examined by ELISA. The specific activities of the seventeen rabbit anti-mammal IgGs-HRP were indicated with western blot. **Conclusion** Rabbit polyclonal antibodies against seventeen mammals labeled with HRP were prepared successfully, it is an useful tool for developing the serological test system of mammals.

【Key words】 Mammal; Secondary antibody; HRP; Label

近年来感染性疾病有了提高的趋势,而且传播速度快、范围广。在人类的感染性疾病中有近 2/3 为人兽共患性疾病,而且这一比例是随着时间提高的,在过去的十几年中,动物源性的感染性疾病已经席卷了全球^[1,2]。哺乳类动物与人类关系密切,是很多人兽共患病病原的宿主、传播媒介和传染源。发展先进的动物病原检测方法,不仅可以有效地保护动物,而且可以防控新发传染病。血清学检测是动物病原检测的重要手段,有着许多不可替代的优势,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,目前全世界都存在着标记的动物二级抗体缺乏的问题。为此本研究分离纯化了恒河猴、东北虎、布氏田鼠、黑线姬鼠、斑羚、原驼、果子狸、食蟹猴、梅花鹿、长爪沙鼠、马鹿、骆驼、大仓鼠、豚鹿、熊猴、大耳羊和雪貂等 17 种哺乳动物的 IgG,免疫大耳白兔制备了兔抗这些动物的二级抗体,并用辣根过氧化物酶(HRP)对制备的二级抗体进行了标记,为这些哺乳动物血清学检测系统的建立提供了重要的工具。

1 材料和方法

1.1 17 种哺乳动物血清 IgG 的分离纯化

取恒河猴、东北虎、布氏田鼠、黑线姬鼠、斑羚、原驼、果子狸、食蟹猴、梅花鹿、长爪沙鼠、马鹿、骆驼、大仓鼠、豚鹿、熊猴、大耳羊和雪貂血,室温静置 1 h,4℃ 过夜,4000 r/min 离心 20 min,得正常血清,分装,-80℃ 保存备用。

恒河猴、东北虎、原驼、果子狸、食蟹猴、马鹿、骆驼、熊猴和雪貂血清 5 mL,用生理盐水等体积稀释后,再以 50% 饱和硫酸铵和 33% 饱和硫酸铵进行分级沉淀,获得初步纯化血清 IgG。初步纯化的样

品再利用 HiTrap Protein A HP 5 mL 预装柱(GE 公司)进行亲和纯化^[3,4]。

布氏田鼠、黑线姬鼠、斑羚、梅花鹿、长爪沙鼠、大仓鼠、豚鹿和大耳羊血清 5 mL,用生理盐水等体积稀释后,再以 50% 饱和硫酸铵和 33% 饱和硫酸铵进行分级沉淀,获得初步纯化血清 IgG。初步纯化的样品再利用 HiTrap Protein G HP 5 mL 预装柱(GE 公司)进行亲和纯化^[5,6]。

1.2 兔抗 17 种哺乳动物抗血清的制备及二级抗体 IgG 的纯化

利用亲和纯的 17 种哺乳动物 IgG 免疫大耳白兔,制备兔抗这 17 种哺乳动物一级抗体的抗血清,具体方法参照文献进行^[5]。抗血清效价用琼脂糖凝胶免疫双扩散方法进行测定^[7]。2.5 mL 兔抗血清用 10 mL PBS(20 mmol/L,pH7.0)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^[8],纯度都经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。

1.3 兔抗 17 种哺乳动物二级抗体的 HRP 标记和标记抗体 ELISA 工作浓度测定

兔抗 17 种哺乳动物二级抗体的 HRP 标记采用过碘酸钠法,具体操作参照文献进行^[8,9]。

用直接 ELISA 法测定标记抗体的工作浓度,先利用亲和纯化的 17 种哺乳动物的 IgG 10 μg/mL,0.1 mL/孔包被 ELISA 板,4℃ 过夜。次日洗涤、封闭,相应的酶标记抗体用 1% BSA-PBS 液依次稀释成 1:1000、1:2000、1:5000、1:10000、1:15000、1:30000、1:60000,分别加入反应孔中,每个稀释度二孔,每孔 0.1 mL,37℃ 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℃ 反应 15 min。以 2 mol/L H₂SO₄ 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^[10]。

1.4 Western blot 方法检测标记抗体

纯化的 17 种哺乳动物 IgG 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^[10]。

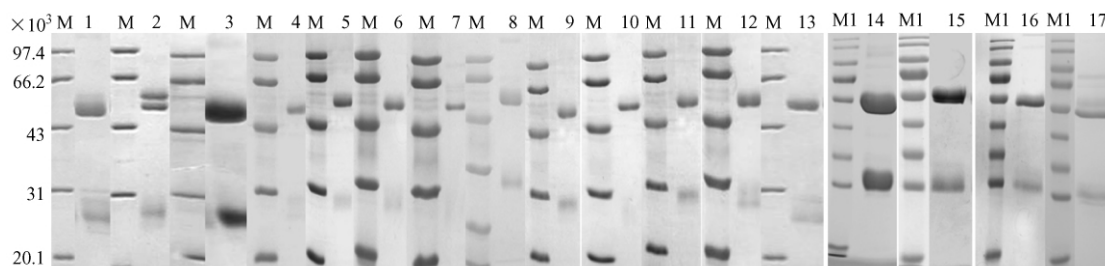


图 1 亲和层析纯化哺乳动物 IgG 的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the purified mammal IgG with Affinity chromatography

注: M, M1: 不同公司的蛋白分子量 marker; 1: 恒河猴 IgG; 2: 虎 IgG; 3: 布氏田鼠 IgG; 4: 黑线姬鼠 IgG; 5: 斑羚 IgG; 6: 原驼 IgG; 7: 果子狸 IgG; 8: 食蟹猴 IgG; 9: 梅花鹿 IgG; 10: 长爪沙鼠 IgG; 11: 马鹿 IgG; 12: 骆驼 IgG; 13: 豚鹿 IgG; 14: 大耳羊 IgG; 15: 大仓鼠 IgG; 16: 熊猴 IgG; 17: 雪貂 IgG

Note: M, M1: standard protein marker from different company; 1: rhesus IgG; 2: tiger IgG;

3: brandt's vole IgG; 4: striped hamster IgG; 5: goral IgG; 6: guanaco IgG; 7: civet cat IgG;

8: crab-eating macaque IgG; 9: sika Deer IgG; 10: mongolian gerbil IgG; 11: red deer IgG;

12: camel IgG; 13: hog deer IgG; 14: ibex IgG; 15: Hamster IgG; 16: assam macaque IgG; 17: ferret IgG

2.2 Protein A 纯化兔抗 17 种哺乳动物二级抗体

用纯化的恒河猴、东北虎、布氏田鼠、黑线姬鼠、斑羚、原驼、果子狸、食蟹猴、梅花鹿、长爪沙鼠、马鹿、骆驼、大仓鼠、豚鹿、熊猴、大耳羊和雪貂等 17 种哺乳动物的 IgG 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 17 种哺乳动物抗血清中的 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 17 种哺乳动物 IgG 进行了 HRP 标记,并用 ELISA 方法对标记产物的效价进行了分析。以 10 μg/mL 的哺乳动物 IgG 包被 ELISA 板,0.1 mL/孔,相应的酶标记抗体用 1% BSA-PBST 进行系列稀释,每个稀释度二孔,37℃ 孵育 1h 后洗涤 3 次。于各反应孔中加入临时配制的

2 结果

2.1 纯化 17 种哺乳动物血清 IgG

利用饱和硫酸铵盐析方法,结合 Protein A 或 Protein G 亲和层析法纯化了恒河猴、东北虎、布氏田鼠、黑线姬鼠、斑羚、原驼、果子狸、食蟹猴、梅花鹿、长爪沙鼠、马鹿、骆驼、大仓鼠、豚鹿、熊猴、大耳羊和雪貂等 17 种哺乳动物的 IgG,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)。

TMB 底物溶液 0.1 mL,37℃ 15 min。以 2 mol/L H₂SO₄ 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

纯化的 17 种哺乳动物 IgG 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:兔抗雪貂 IgG-HRP 1:20000;兔抗恒河猴、虎 IgG-HRP 1:8000,兔抗布氏田鼠、黑线姬鼠、斑羚、果子狸、食蟹猴、长爪沙鼠、豚鹿、熊猴 IgG-HRP 1:4000;兔抗梅花鹿、骆驼、大仓鼠、大耳羊 IgG-HRP 1:2000;兔抗原驼、马鹿 IgG-HRP 1:1000。Western blot 结果见图 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 mammal IgG	ELISA 工作浓度 ELISA working dilutions	二级抗体 Rabbit polyclonal antibodies against mammal IgG	ELISA 工作浓度 ELISA working dilutions
兔抗恒河猴 IgG Anti-rhesus IgG	1:30000	兔抗虎 IgG Anti-tiger IgG	1:30000
兔抗布氏田鼠 IgG Anti-brandt's vole IgG	1:15000	兔抗黑线姬鼠 IgG Anti-striped hamster IgG	1:15000
兔抗斑羚 IgG Anti-goral IgG	1:15000	兔抗原驼 IgG Anti-guanaco IgG	1:2000
兔抗果子狸 IgG Anti-civet cat IgG	1:15000	兔抗食蟹猴 IgG Anti-crab-eating macaque	1:15000
兔抗梅花鹿 IgG Anti-sika deer IgG	1:5000	兔抗长爪沙鼠 IgG Anti-mongolian gerbil IgG	1:15000
兔抗马鹿 IgG Anti-red deer IgG	1:2000	兔抗骆驼 IgG Anti-camel IgG	1:5000
兔抗大仓鼠 IgG Anti-hamster IgG	1:5000	兔抗豚鹿 IgG Anti-hog deer IgG	1:15000
兔抗熊猴 IgG Anti-assam macaque IgG	1:15000	兔抗大耳羊 IgG Anti-ibex IgG	1:5000
兔抗雪貂 IgG Anti-ferret IgG	1:60000		

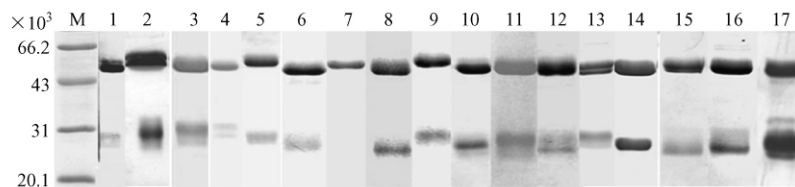


图 2 Western blot 检测酶标抗体的特异性

Fig. 2 Determination of the specificity of HRP-IgG of rabbit anti-mammals with Western blot

注: M: 蛋白分子量 marker; 1: 恒河猴 IgG; 2: 虎 IgG; 3: 布氏田鼠 IgG; 4: 黑线姬鼠 IgG; 5: 斑羚 IgG; 6: 原驼 IgG; 7: 果子狸 IgG; 8: 食蟹猴 IgG; 9: 梅花鹿 IgG; 10: 长爪沙鼠 IgG; 11: 马鹿 IgG; 12: 骆驼 IgG; 13: 豚鹿 IgG; 14: 大耳羊 IgG; 15: 大仓鼠 IgG; 16: 熊猴 IgG; 17: 雪貂 IgG

Note: M: standard protein marker; 1: rhesus IgG; 2: tiger IgG; 3: brandt's vole IgG; 4: striped hamster IgG; 5: goral IgG; 6: guanaco IgG; 7: civet cat IgG; 8: crab-eating macaque IgG; 9: sika Deer IgG; 10: mongolian gerbil IgG; 11: red deer IgG; 12: camel IgG; 13: hog deer IgG; 14: ibex IgG; 15: Hamster IgG; 16: assam macaque IgG; 17: ferret IgG

3 讨论

哺乳动物是与人类关系最为密切的物种之一,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,是农村经济的支柱产业之一,哺乳动物还是人类食物的重要来源,有些哺乳动物也是科学工作中重要的实验动物。由于哺乳动物与人类关系密切,亲缘关系又比较近,所以哺乳动物成为了许多人兽共患病的传播媒介或传染源^[11],如狂犬病、弓形虫病等就是由宠物狗、猫等传染给人类的人兽共患感染性疾病,流行性出血热、鼠疫等就是由啮齿类动物传播的严重的传染病,布鲁氏菌等是由牛、羊等经济动物传播的人兽共患疾病。动物疫病的发生不仅威胁道人类的健康,也会给国民经济带来重大损失。因此建立有效的哺乳动物病原检测技术,控制哺乳动物疫病的发生,对保障人类的健康和社会的发展具有重要的意义。

血清学检测技术既可以检测正在感染的动物,

又可以检测既往感染的动物,而且取材简单,在病原检测中具有不可替代的作用,因此建立这些动物的血清学检测体系对保障社会经济发展和人类健康具有重要的意义。标记的二级抗体的缺乏是制约血清学检测体系建立的重要因素,本研究制备了 HRP 标记的兔抗恒河猴、东北虎、布氏田鼠、黑线姬鼠、斑羚、原驼、果子狸、食蟹猴、梅花鹿、长爪沙鼠、马鹿、骆驼、大仓鼠、豚鹿、熊猴、大耳羊和雪貂等 17 种哺乳动物的二级抗体,结合之前制备的 HRP 标记的兔抗狗、家猫、豚鼠、金仓鼠、松鼠、花鼠和龙猫等 7 种宠物的二级抗体^[12],和 HRP 标记的兔抗家猪,绵羊、山羊、牛、马、驴、狐狸、貉和黑貂等 9 种重要经济动物的二级抗体^[13],及 HRP 标记的兔抗蝙蝠 IgG,共计制备了 34 种哺乳动物的标记二级抗体。这 34 种哺乳动物分别分布在 6 个目、10 个科中,既包含宠物、经济动物,也包含恒河猴、食蟹猴、雪貂等重要的实验动物,还包括东北虎等珍稀动物。这个标记的二级抗体库的建立,部分的解决了中国乃至世界范围内的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,为控制动物疫病,保障国民经济发展,保护珍稀动物、保证人类健康和应对新发传染病做了技术储备和资源储备。

参考文献:

- [1] Kate EJ, Nikkita GP, Marc AL, et al. Global trends in emerging infectious diseases[J]. Nature, 2008, 451: 990 - 994.
- [2] S. Cleaveland, M. K. Laurenson, L. H. Taylor. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence[J]. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 2001, 356: 991 - 999.
- [3] 刘先菊,杨帆,林树柱,等. 虎血清免疫球蛋白(IgG)的纯化及纯度、活性鉴定[J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(11): 637 - 640.
- [4] 刘先菊,林树柱,杨帆,等. 两种果子狸血清 IgG 纯化方法的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(11): 681 - 682.
- [5] 刘先菊,杨帆,林树柱,等. 长爪沙鼠 IgG 的纯化及抗血清的制备[J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(11): 641 - 643.
- [6] 刘先菊,林树柱,杨帆,等. 黑线毛足鼠和金仓鼠血清 IgG 的纯化及抗血清的制备[J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(11): 656 - 658.
- [7] 林树柱,李万波,刘先菊,等. 乌鲤血清免疫球蛋白 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 刘先菊,林树柱,杨帆,等. 蝙蝠血清 IgG 的纯化及兔抗蝙蝠 IgG 酶标抗体的制备[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(5): 37 - 40.
- [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.
- [12] 林树柱,刘先菊,杨帆,等. 七种常见宠物二级抗体的制备和 HRP 标记[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(6): 51 - 54.
- [13] 林树柱,刘先菊,杨帆,等. 九种重要经济动物二级抗体的制备和 HRP 标记[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(6): 55 - 58.

(修回日期)2010-11-15