

鸡缩胆囊素卵黄抗体的制备与应用研究

刘洁珠, 卢秉娟, 许丹芸 (佛山科学技术学院生命科学院, 广东南海 528231)

摘要 [目的]制备缩胆囊素卵黄抗体,研究其对肉鸡生长的促进作用。[方法]采用缩胆囊素(CCK)融合蛋白作为免疫原制备油乳剂疫苗免疫产蛋鸡。采用ELISA检测蛋鸡血清、蛋黄液、蛋黄粉中CCK抗体效价。[结果]20日龄胡须鸡饲养试验结果表明饲料中分别添加200和500 g/t含CCK抗体卵黄粉的胡须鸡试验全期体增重较阴性蛋黄粉组分别提高4.14%和5.52%,而采食量则分别提高2.14%和2.75%,但差异均不显著($P>0.05$),且对料重比无显著影响。ELISA结果表明CCK融合蛋白能在鸡体内引起免疫反应,加强免疫后蛋鸡的血清和蛋黄中的CCK抗体均可维持在较高水平。[结论]缩胆囊素卵黄抗体对胡须鸡有一定的促生长作用。

关键词 缩胆囊素;卵黄抗体;生长性能

中图分类号 S821.62*9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)24-10000-02

Studies on the Preparation and Application of Anti-cholecystokinin Yolk Antibodies

LIU Jie-zhu et al (College of Life Sciences, Foshan University, Nanhai, Guangdong 528231)

Abstract [Objective] The research aimed to prepare anti-cholecystokinin yolk antibodies and study its promotive effects on growth of broiler chicken. [Method] The soluble cholecystokinin fusion proteins were used as antigen to prepare oil-emulsion vaccines and immune the laying hens. The titers of CCK antibodies in the serum, yolk liquid and yolk powder of laying hens were detected by ELISA. [Result] The feeding trial results of 20-day-old Huxu chicken showed that the weight gain of Huxu chicken which was fed with the diet adding 200 and 500 g/t CCK-containing yolk powder increased by 4.14% and 2.14% than that in negative yolk powder group respectively, and the feed intake increased by 5.25% and 2.75% respectively. But the differences were not significant ($P>0.05$) and it had no significant effect on feed-gain ratio. ELISA results indicated that CCK fusion protein could induce immune response and CCK antibody level in the serum and yolk of laying chicken could maintain a high level after immunization. [Conclusion] Anti-cholecystokinin yolk antibodies could promote the growth of Hu-xu chicken.

Key words Cholecystokinin; Yolk antibody; Growth performance

动物采食量的高低直接影响其生产性能,采食量过低将会显著降低动物的生产性能。特别是在现代高度集约化或绿色散养的生产条件下,动物采食量不足已成为普遍现象,因此如何提高畜禽的采食量是当今许多畜牧生产者或研究者最为关心的问题之一。缩胆囊素(Cholecystokinin, CCK)是由小肠近端I细胞和中枢神经细胞分泌的一种脑肠肽,具有刺激胰酶分泌和胆囊收缩、降低胃排空、调节小肠运动、促进胰岛中胰岛素和生长抑素释放的作用。同时,CCK也是机体内一种饱感因子,能够抑制胃排空^[1-3]。1973年,Gibbs等报道给小鼠服用CCK可抑制其采食以来,CCK的饱信号作用引起了人们很大的兴趣。40年以来,人们对CCK进行了大量研究,探讨CCK产生饱感抑制采食的机制和应用^[4-5]。笔者以融合表达的CCK抗原免疫产蛋鸡来制备CCK卵黄抗体粉,再以三黄胡须鸡为动物模型,研究含不同剂量CCK抗体的卵黄粉对鸡生长性能的影响,旨在为实际生产中CCK卵黄抗体的合理利用提供指导。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 兔抗CCK-8阳性血清、CCK-8肽、阴性血清、Tween-20,均购自Sigma公司;兔抗鸡IgG-HRP、底物TMB,购自广州博理生物科技有限公司;96孔平底聚苯乙烯酶标板,为美国Coring公司产品;酶标仪,为山东高密彩虹分析仪器厂产品;DS-1型高速组织捣碎机,购自广州云荟贸易有限公司;FD-1B冷冻干燥机,为北京医博康实验仪器有限公司产品;LPG-5型高速离心喷雾干燥机,为常州干燥

设备有限公司产品。CCK融合蛋白由华南农业大学基因工程实验室制备。实验动物选用30周龄褐壳蛋鸡、20天龄三黄胡须鸡。

1.2 试验方法

1.2.1 蛋鸡免疫试验。将CCK融合蛋白分别制成浓度为0.5和1.5 mg/ml的油乳剂疫苗。选用30周龄健康褐壳蛋鸡90只,随机分为3组,每组30只。第1组为空白对照组,第2组为主动免疫0.5 mg/ml重组疫苗组,第3组为主动免疫1.5 mg/ml重组疫苗组。分组后开始免疫,每次免疫2 ml/只,每20天免疫1次,共免疫3次。分别于免疫前1 d、每次免疫后8 d和试验第70天早上每组随机抽取10只采血和收鸡蛋制备血清样品和蛋黄样品;将制备的阳性和阴性血清样品和蛋黄样品用经超声波破碎的大肠杆菌吸附处理后,用建立的ELISA法测定抗体水平,检测抗原为自制CCK-70融合蛋白。

1.2.2 ELISA检测蛋鸡血清、蛋黄液、蛋黄粉中CCK抗体效价操作程序。用包被缓冲液对抗原进行一定稀释,每孔加入100 μ l于酶标板中,4 $^{\circ}$ C过夜,弃包被液,用洗涤液PBST(含0.05% Tween-20, pH 7.2)洗板3次,每次5 min,然后加入100 μ l/孔的封闭液于37 $^{\circ}$ C反应2 h。取出洗板(同上),将待检蛋黄样品用稀释液进行稀释,加于包被好的反应孔内,37 $^{\circ}$ C反应1.5 h。取出洗板(同上),再加入稀释好的酶标二抗,37 $^{\circ}$ C下反应60 min。取出洗板(同上),最后加入底物缓冲液100 μ l/孔,反应5~10 min后每孔加入100 μ l 1 mol/L H_2SO_4 终止反应,在酶标仪上波长450 nm处读取其吸光度值。

1.2.3 冷冻真空干燥法制备蛋黄粉。将收集到的含高水平的CCK抗体的鸡蛋分离蛋清,收集蛋黄液加入等量的PBS

(磷酸盐缓冲液),在组织捣碎机中搅拌均匀,纱布过滤。将分离好的蛋黄放入冰箱冻结成软块状;打开冷冻真空干燥机,等冷阱温度达到 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 并维持 20 min 以上即可将蛋黄块放入物料架,盖好真空罩,对好底下的密封圈,再打开真空表和真空泵开关,进行冷冻真空干燥,将干燥后的物料块粉碎后密封保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

1.2.4 肉鸡饲养试验。将 360 只三黄胡须鸡饲养到 20 日龄后随机分为 4 个处理组,每组 3 个重复,每个重复 30 只,所有试验鸡均为母鸡。试验周期 70 d ,自由采食。第 1 组为对照组,饲喂基础日粮;第 2 组为阴性蛋黄粉添加组,饲喂基础日粮+阴性蛋黄粉(200 g/t);第 3 组为低剂量CCK抗体添加组,饲喂基础日粮+含CCK抗体蛋黄粉(200 g/t);第 4 组为高剂量CCK抗体添加组,饲喂基础日粮+含CCK抗体蛋黄粉(500 g/t)。整个试验期间统计三黄胡须鸡全期采食量和体增重,并计算料重比。

1.2.5 数据统计与分析。所有试验结果均以平均值 \pm 标准误差表示,采用SAS6.12软件对试验数据进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 蛋鸡免疫试验 分别于试验前 1 d 、每次免疫后第 8 天(即蛋鸡第 238 、 258 、 278 和 300 天)采集血液样品和收集鸡蛋,分别制备血清和蛋黄液样,进行ELISA检测。从表1~2可以看出,3次免疫后所采集的血清和蛋黄中,空白对照组 P/N 值均小于 2 ,且变化幅度较小;而试验组的抗体效价呈增加趋势,且 P/N 值均大于 2 (除首免后检测外)。参照舒鼎铭等的方法(P/N 值 >2 ,为阳性)^[6],可判断制备抗血清及蛋黄为阳性,表明主动免疫CCK可在鸡体内产生相应抗体,且明显高于对照组($P<0.05$)。 0.5 和 1.5 mg/ml 抗原免疫蛋鸡产生CCK抗体略有增加,但差异不显著。

表1 蛋鸡免疫后血清中CCK抗体效价ELISA检测结果

组别	P/N值			
	238 d	258 d	278 d	300 d
I	1.046 \pm 0.020a	1.105 \pm 0.057a	1.089 \pm 0.061a	1.023 \pm 0.067a
II	1.983 \pm 0.052Db	2.716 \pm 0.033Bb	3.268 \pm 0.071Ab	2.408 \pm 0.042Cb
III	2.046 \pm 0.032Db	2.802 \pm 0.042Bb	3.533 \pm 0.047Ab	2.551 \pm 0.039Cb

注:同行不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$);同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

表2 蛋鸡免疫后蛋黄中CCK抗体效价ELISA检测结果

组别	P/N值			
	238 d	258 d	278 d	300 d
I	0.981 \pm 0.026a	1.088 \pm 0.047a	0.997 \pm 0.055a	1.030 \pm 0.049a
II	1.971 \pm 0.043Cb	2.801 \pm 0.025Bb	3.104 \pm 0.041Ab	2.006 \pm 0.044Cb
III	1.997 \pm 0.019Cb	2.855 \pm 0.038Bb	3.227 \pm 0.060Ab	2.178 \pm 0.059Cb

注:同列不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$);同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.2 肉鸡饲养试验 从表3可以看出,与阴性蛋黄粉组相比,饲喂饲料中分别添加 200 和 500 g/t 含CCK抗体卵黄粉的胡须鸡试验全期体增重分别提高 4.14% 和 5.52% ;采食量则分别提高 2.14% 和 2.75% ,但差异均不显著($P>0.05$)。

3 讨论与结论

免疫调控作为一种控制手段来调节动物生长在畜牧生

表3 各试验组胡须鸡的体增重、采食量和料重比

组别	体增重//g/只	采食量//g/只	料重比
I	798.20 \pm 18.78	3 017.27 \pm 33.15	3.78 \pm 0.02
II	802.42 \pm 25.74	3 025.11 \pm 26.58	3.77 \pm 0.04
III	835.67 \pm 34.16	3 089.75 \pm 42.91	3.70 \pm 0.05
IV	846.73 \pm 29.03	3 108.37 \pm 35.22	3.67 \pm 0.03

产中很早就引起人们的关注和使用,特别对于具有抑制性作用的物质进行免疫中和是提高动物生产力的有效途径。禽类作为特定抗原免疫后,可以产生相应的特异性抗体,并不断储存于蛋黄中,这种抗体称为卵黄抗体。20世纪初,人们就认识到鸡的抗体具有从血液转移到卵黄中的特性,因此可以从卵黄中获得大量特异性的多克隆抗体,用于疾病的诊断与防治。在现代的畜牧生产中,越来越多的抗生素被禁用,因此抗生素替代品的研究日益得到重视。IgY是禽蛋中天然存在的物质,没有残留和毒副作用,不会使细菌产生抗药性,而且兼具营养功能,在饲料中添加IgY不仅不益于动物健康,而且可以改善生产性能。该研究利用禽蛋具有生物反应器的功能,将融合表达的CCK蛋白作为抗原在蛋鸡免疫反应后产生CCK抗体,并收集含相对恒定CCK抗体的鸡蛋制备蛋黄粉,作为肉鸡提高采食量促生长的添加剂,应用于肉鸡饲养试验。与阴性蛋黄粉组相比,饲喂饲料中分别添加 200 和 500 g/t 含CCK抗体卵黄粉的胡须鸡试验全期体增重分别提高 4.14% 和 5.52% ,而采食量则分别提高 2.14% 和 2.75% 。这与某些报道的研究结果相一致^[4-5],但效果不理想。这可能是因为卵黄抗体属于大分子物质,在消化道中吸收受限,最后能进行试验动物机体内发挥生物学作用的量不够;也可能是因为动物机体作为一个有机整体,人为通过其他途径改变体内的平衡状态,机体会根据外界的干预情况进行作出调整或应激反应,因此缩胆囊素抗体在胡须肉鸡体内的有效浓度不够或是在体内能够中和鸡体内自身产生的CCK的数量不多,机体补偿性地多分泌CCK以维持体内的平衡。

笔者通过蛋鸡免疫试验制备了含CCK抗体的粗制卵黄粉。三黄胡须肉鸡饲养试验结果表明在该试验条件下该卵黄粉可在一定程度上提高肉鸡的采食量和生长性能,但效果还不够理想,有待进一步提高。该研究可为开发CCK卵黄抗体作为畜禽绿色饲料添加剂奠定一定的基础。

参考文献

- [1] DELLA-FERA M A, BAILE C A. Cholecystokinin octapeptide: Continuous picomole injections into the cerebral ventricles of sheep suppress feeding [J]. Science, 1979, 206: 471-473.
- [2] BEINFELD M C. An introduction to neuronal cholecystokinin [J]. Peptides, 2001, 22: 1197-1200.
- [3] HANSEN T V O. Cholecystokinin gene transcription: promoter elements, transcription factors and signaling pathways [J]. Peptides, 2001, 22: 1201-1211.
- [4] PEKAS J C, TROUT W E. Stimulation of food intake and growth of swine by cholecystokinin immunization [J]. Dev Aging, 1990, 54: 51-56.
- [5] PEKAS J C. Immunogenicity of cholecystokinin octapeptide - conjugated antigens in pigs [J]. Animal Science, 1996, 74: 1953-1958.
- [6] 舒鼎铭, 覃健萍, 曹永长. 鸡缩胆囊素-33串的构建、原核表达及免疫原性研究 [J]. 华南农业大学学报, 2006(2): 96-99.