

苦皮藤素V-BSA 对家兔的免疫原性研究^{*}

杨润亚^{1,2}, 祁志军¹, 吴文君¹

(1 西北农林科技大学 农药研究所, 陕西 杨凌 712100; 2 烟台师范学院 生命科学学院, 山东 烟台 264025)

[摘 要] 研究了苦皮藤素V (CA) 分别采用混合酸酐法和碳化二亚胺法合成的苦皮藤素V 人工抗原CA-BSA 1, CA-BSA 2 的免疫原性。结果表明, 两种方法合成的人工抗原都具有一定的免疫原性, 可诱导家兔产生抗苦皮藤素V 的特异性抗体, 但产生的抗体浓度较低, 用琼脂双扩散法不能检测到产生的抗体, 而ELISA 法可检测到苦皮藤素V 的特异性抗体, 且检测结果表明, 随免疫次数的增加, 家兔体内抗苦皮藤素V 特异性抗体浓度也随之增加, 但增加幅度并不为指数增长方式。

[关键词] 植物源杀虫剂; 苦皮藤素V; 人工抗原; 免疫原性

[中图分类号] S852.4⁺4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)11-0027-03

低分子质量的半抗原与大分子载体结合成人工抗原后可具有免疫原性, 能诱导机体产生半抗原的抗体, 从而使建立半抗原的免疫分析技术成为可能^[1]。人工抗原的免疫原性与多种因素有关。不同半抗原制备的人工抗原的免疫原性不同, 同一半抗原与不同载体或同一种载体采用不同方法制备的人工抗原的免疫原性强弱也有差异, 免疫原性较差的人工抗原不能制备出满意的抗体。本试验研究了以一种植物源农药活性小分子物质苦皮藤素V (CA) 与牛血清白蛋白 (BSA), 采用两种方法合成的苦皮藤素V 人工抗原CA-BSA 1, CA-BSA 2 的免疫原性, 并比较了两种方法合成的同一种人工抗原的免疫原性强弱, 以期建立苦皮藤素V 的免疫分析技术提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

试验动物 从西北农林科技大学种兔厂购回8只雄性家兔, 体重(2.83±0.14) kg。用福氏完全佐剂对试验家兔进行基础免疫, 激活家兔的免疫系统待用^[2]。

主要试剂 以CA-BSA 1(采用混合酸酐法自制^[3])和CA-BSA 2(采用碳化二亚胺法自制^[4])作为免疫抗原; CA-OVA, 采用混合酸酐法自制作作为ELISA 包被抗原; BSA、OVA、福氏完全佐剂、福氏

不完全佐剂、HPR-羊抗兔酶标二抗、TMB 均为Sigma 公司产品。其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 对家兔的主动免疫 (1) 抗原液的制备。按常规免疫剂量, 分别称取CA-BSA 1 和CA-BSA 2, 溶于注射用水后再逐滴滴入等体积福氏完全佐剂的研钵中, 边滴加边研磨直至形成白色油包水型乳液, 使抗原质量浓度达到1 mg/mL。加强免疫时, 将抗原溶于注射用水后再逐滴滴入含等体积福氏不完全佐剂的研钵中, 边滴加边研磨直至形成白色油包水型乳液(抗原质量浓度1.5 mg/mL)。第二次及其以后加强免疫时, 抗原含量比首次免疫增加1.5倍(抗原质量浓度2.5 mg/mL), 且可不用佐剂乳化, 直接用注射用水溶解后即可免疫动物^[5]。

(2) 免疫方法。福氏完全佐剂基础免疫10 d 后, 将家兔随机分为两组, 一组3只, 分别为1~3号, 用碳化二亚胺法合成的CA-BSA 2 进行免疫; 另一组5只, 分别为4~8号, 用混合酸酐法合成的CA-BSA 1 进行免疫。首次免疫时, 每只家兔四足掌共注射0.8 mL (0.2 mL/足掌), 4条腿的腋部各皮下注射0.2 mL, 背部脊椎两侧4点各皮下注射0.1 mL, 免疫总量为2 mL/只(抗原2 mg/只)。3周后第1次加强免疫, 每只兔4条腿的腋部各皮下注射0.2 mL, 背部脊椎两侧4点各皮下注射0.1 mL, 两侧大腿肌肉各注射0.4 mL, 免疫总量为2 mL/只(抗原3

^{*} [收稿日期] 2003-09-22

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(30130130); 烟台师范学院中青年自然科学基金项目(000443)

[作者简介] 杨润亚(1974-), 女, 陕西蒲城人, 博士, 主要从事农药毒理研究。现在烟台师范学院生命科学学院工作。

[通讯作者] 吴文君(1945-), 男, 四川洪雅人, 教授, 主要从事天然产物农药研究。

mg/只)。以后每隔 2 周加强免疫 1 次,免疫途径与加强免疫相同,免疫总量为 2 mL/只(抗原 5 mg/只)。从第 2 次加强免疫开始,每次加强免疫 7 d 后采血检测抗体的产生^[6]。共免疫 11 次。

1.2.2 采血及血清的分离 采用心脏采血法^[6]抽出血液。将采集的血液先于室温下静置,待血球凝集后转入 37℃ 孵箱中放置 0.5~1 h,再转入 4℃ 冰箱内,24 h 后分离血清并分装,置冰箱保存备用。

1.2.3 抗体的检测 分别用琼脂双扩散法^[7]和 ELISA 法^[8]进行抗体检测。

2 结果与分析

采用两种方法合成的人工抗原免疫家兔,均获得了抗苦皮藤素 V 的特异性抗体。在免疫过程中,3、5 和 8 号家兔在第 4 次加强免疫前因病死亡。

2.1 抗体的琼脂双扩散法检测结果

对于 100 μg/mL 的人工抗原(CA-BSA, CA-OVA)及其载体(BSA, OVA),不同家兔的抗血清对同一种检测抗原都表现出相同的结果,即从第 2 次加强免疫开始,8 只家兔的抗血清都与 CA-BSA 及 BSA 产生沉淀线,与 10 μg/mL 的 CA-BSA 及 BSA 也能产生沉淀线,而与 CA-OVA 及 OVA 均不产生沉淀线。以后各次加强免疫所得血清的抗体用琼脂

双扩散法检测结果与此一致。

由此可以看出,琼脂双扩散法检测中形成的沉淀线是 BSA 与其产生的抗体,而不是苦皮藤素 V 与其特异性抗体的沉淀线。因此,本研究中琼脂双扩散法的灵敏度不足以检测抗体的产生,也表明本研究中人工抗原对试用家兔的免疫原性较差,没有产生抗半抗原的高效价抗体。

2.2 抗体的 ELISA 法检测结果

以 CA-OVA 为包被抗原进行 ELISA 初步检测结果表明,第 4 次加强免疫后家兔体内即产生了抗苦皮藤素 V 的特异性抗体。分别以 10, 20, 40, 80, 100 μg/mL CA-OVA 为包被抗原筛选 CA-OVA,作为包被抗原进行 ELISA 的工作浓度,结果以 40 μg/mL 为最佳(以上述 5 个质量浓度的 OVA 溶液为包被抗原时的 ELISA 结果均为阴性,而以 CA-BSA 及 BSA 溶液为包被抗原时的 ELISA 结果均为阳性,这与琼脂双扩散法得到的结果一致)。经过筛选本研究中 ELISA 检测加样量选择 50 μL,酶标二抗的工作浓度选择 1 000 倍稀释液。

以上述选定的 ELISA 工作条件,对第 4 次加强免疫及其以后加强免疫所得的抗体效价进行测定,结果见表 1、2。

表 1 第 8 次加强免疫后各动物体内抗血清效价的 ELISA 结果

Table 1 The ELISA result of each rabbit antisera after 8th boost immuning

家兔编号 Test rabbit No.	稀释倍数 Diluting times					
	10	20	40	80	160	320
1#	1.4/-	1.2/-	1.2/-	1.5/-	1.1/-	0.7/-
2#	2.2/+	2.2/+	2.2/+	1.7/-	1.8/-	1.5/-
4#	2.0/-	1.7/-	1.4/-	1.5/-	1.4/-	1.0/-
6#	2.6/+	2.4/+	2.5/+	2.2/+	2.2/+	2.1/-
7#	2.9/+	2.6/+	2.1/+	1.3/-	0.9/-	0.6/-

注:表中数据为 P/N 值(P 为免疫血清 492 nm 时吸光值,N 为阴性血清 492 nm 时吸光值),当大于 2.1 时表示呈阳性反应,用“+”表示;小于 2.1 时表示呈阴性反应,用“-”表示。下表同。

Note: The data in table are N/P values(P indicates absorption at 492 nm of antisera, N indicates absorption at 492 nm of negative), the result representing with “+” was positive when the value was > 2.1 and the result representing with “-” was negative when the value < 2.1. It is the same in the following table.

表 2 免疫不同次数后 6 号家兔所得抗血清的 ELISA 结果

Table 2 The ELISA result of antisera of 6# rabbit after being inoculated for different times

免疫次数 Inoculated times	稀释倍数 Diluting times					
	10	20	40	80	160	320
5	2.2/+	1.7/-	-	-	-	-
7	2.3/+	2.2/+	2.0/-	-	-	-
8	2.4/+	2.3/+	2.3/+	2.1/-	-	-
9	2.5/+	2.4/+	2.4/+	2.4/+	2.2/+	-
10	2.5/+	2.4/+	2.4/+	2.4/+	2.2/+	-
11	2.6/+	2.5/+	2.5/+	2.4/+	2.4/+	2.2/+

表 1, 表 2 结果表明, 当第 8 次加强免疫后, 3 只家兔(2 号、6 号、7 号)体内产生了抗半抗原苦皮藤素 V 的抗体, 抗体效价差别较大, 6 号家兔较高(160 倍), 2 号、7 号家兔较低; 另 2 只家兔(1 号、4 号)未能产生抗苦皮藤素 V 的抗体。对于产生抗体的同一家兔, 随着免疫次数的增加, 家兔体内抗苦皮藤素 V 特异性抗体的浓度也随之增加, 但增加幅度并不为指数增长方式(表 2)。

3 讨 论

本研究用自制的苦皮藤素 V-B SA 对家兔进行了长达 5 个月的免疫试验, 结果表明, 两种方法合成的人工抗原都可诱导家兔产生抗苦皮藤素 V 的特异性抗体, 表明所用的两种人工抗原都具有一定的免疫原性, 但其免疫原性有一定差异, 混合酸酐法合成的人工抗原比碳化二亚胺法合成的人工抗原免疫原性稍强。由于本研究中家兔个体之间的差异较大, 即使对于同一种方法合成的同一种人工抗原, 其免疫原性也因对不同的家兔而表现出强弱不同, 有的个体抗体效价较高(6 号家兔), 有的个体抗体效价较低(2 号家兔及 7 号家兔), 有的个体不能产生抗体(1 号家兔及 4 号家兔)。由于本研究中样本数量太小无法进行统计分析, 因此无法比较分别由两种方法合成的同一人工抗原的免疫原性, 还需要进一步研究确证。

在用人工抗原制备的抗体中, 可能有半抗原的抗体, 也可能有载体的特异性抗体, 而且载体的抗体

更易被诱发产生, 因此保证检测到的抗体是针对小分子半抗原的特异性抗体成为一个重要问题。通常采用由另外一种载体(和免疫原中载体的抗体没有交叉反应)和半抗原合成的人工抗原作为检测抗原, 检测由免疫原制备的抗体, 若能产生阳性反应则证明免疫反应是半抗原与其特异性抗体之间的反应^[9~11]。王刚垛等^[12]采用双向琼脂扩散试验, 以甲基对硫磷(M 1605)-中国鲎血蓝蛋白(TTH)为检测抗原, 检测由 M 1605-B SA 第 4 次免疫后得到的抗体, 结果 12 h 后观察到沉淀线, 表明检测出了半抗原 M 1605 的特异性抗体。琼脂双扩散法经济、简便, 经常被用于抗原抗体反应的检测。但琼脂双扩散法的灵敏度较低, 检测值为 1 mg/mL, 当抗体质量浓度较低时检测不到抗体的产生。本研究采用与免疫人工抗原中载体(B SA)不同的另一种载体(OVA), 与半抗原(CA)合成的人工抗原(CA-OVA)作为检测抗原, 检测由人工抗原 CA-B SA 制备的抗体是否有半抗原 CA 的特异性抗体。但用琼脂双向扩散法未出现沉淀线, 即没有检测到 CA 的抗体; 而采用 ELISA 法检测出了 CA 的抗体。表明本研究所制的抗体中虽然含有抗苦皮藤素 V 的抗体, 但其质量浓度较低, 以致琼脂双扩散法的灵敏度不足以检测到它的存在。针对这一问题, 除可对免疫方案做进一步改进, 包括试验动物的选择, 免疫途径和免疫剂量的选择及免疫间隔时间的确定等, 还可通过更换载体制备免疫原性更强的人工抗原。

[参考文献]

- [1] 陈新建 免疫学技术在植物科学中的应用[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1998
- [2] 童德文 苦豆毒素-B SA 对家兔的免疫原性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2001, 29(5): 11- 14
- [3] Erlanger B F, Borek O F, Beiser S, et al Steroid-protein conjugates II: preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with progesterone, deoxycorticosterone and oestrone[J]. J Biol Chem, 1959, 243: 1090- 1094
- [4] Langone J J, Van V H. Radioimmunoassay for dieldrin and dldrin[J]. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1975, 10: 163- 171
- [5] Alan J, Robin T. Immunochemistry in Practice[M]. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1982 27- 39
- [6] 曹澎泽 兽医微生物学及免疫学技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1983 332- 342
- [7] 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
- [8] 余传霖, 叶天星, 陈德源 现代医学免疫学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1998 679- 680
- [9] Bull J P, Serreque A N, Gamboa H R, et al Improved enzyme-linked immunosorbent assay to detect didecyldimethylammonium chloride, a quaternary ammonium compound[J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 4779- 4786
- [10] Gueguen F, Boside F, Queffelec A L, et al Hapten synthesis for the development of a competitive inhibition enzyme-immunoassay for thiram[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 4492- 4499
- [11] Wengatz I, Stoutantire D W, Gee S J, et al Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the pyrethroid insecticide fenprothrin[J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 2211- 2221
- [12] 王刚垛, 马兆扬, 鱼涛, 等 甲基对硫磷人工抗原的合成及鉴定[J]. 卫生研究, 2000, 29(2): 69- 70

(下转第 33 页)

- angulatus[J]. J Nat Prod, 1988, 51(3): 537- 542
- [4] Wu W J, Tu Y Q, Liu H X, et al Celangilin, III and IV: new insecticidal sesquiterpenoids from *Celastrus angulatus*[J]. J Nat Prod, 1992, 55(9): 1294- 1298
- [5] 祁志军, 姬志勤, 秦宝福, 等. 0.2% 苦皮藤素乳油在土壤中的吸附与降解[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(3): 73- 77.
- [6] 吴文君, 刘惠霞, 姬志勤, 等. 植物杀虫剂 0.2% 苦皮藤素乳油的研究与开发[J]. 西北农业大学学报, 2000, 28(5): 18- 21.
- [7] 吴文君, 刘惠霞, 朱靖博, 等. 天然产物杀虫剂——原理·方法·实践[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1998
- [8] 杨征敏, 吴文君, 钮绪燕. 卫矛科植物苦皮藤杀菌活性研究初报[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(5): 74- 76
- [9] 钮绪燕, 吴文君, 丁 伟, 等. 新杀菌剂霜疫必克的室内毒力测定及大田药效[J]. 西北农业学报, 1993, 2(1): 83- 86
- [10] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996
- [11] 农业部农药鉴定所生测室. 农药田间药效试验准则(一)[M]. 北京: 中国标准出版社, 1993

Activity test on celangulin fungicide against *Pseudoperonospora cubensis*

NIU Xu-yan¹, ZHAN Gang-ming¹, JI Zhi-qin¹, SHIL i-long², WANG Xue-hui¹

(1 Institute of Pesticide, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Shandong Zhongshi Chemical Group, Yanggu, Shandong 252317, China)

Abstract: The result of the bioassay against *Pseudoperonospora cubensis* showed that 4% celangilin wettable powder and 4% celangilin emulsifiable concentrates would have strong effect on inhibiting the germination of the sporangium. At 40 mg/L concentration, their inhibiting rates can both reach 100%. The pot experiment showed that whether in host's cotyledon or euphylla period, 4% celangilin wettable powder has good protective efficacy and remarkable therapeutic efficacy, and its control efficacies are better than metalaxyl during the two host's growing periods

Key words: botanical fungicide; celangilin; *Pseudoperonospora cubensis*

(上接第 29 页)

Study on immunogenicity of Celangulin V-BSA to rabbit

YANG Run-ya^{1,2}, QI Zhi-jun¹, WU Wen-jun¹

(1 Institute of Pesticide, Northwest A & F University, Shaanxi, Yangling 712100, China;

2 College of Life Sciences, Yantai Normal University, Shandong, Yantai 264025, China)

Abstract: The study on immunogenicity of two artificial antigen of Celangulin V, the active compound of one kind of botanical insecticide- CA-BSA 1 and CA-BSA 2, prepared by mixed anhydride method and carbodimide method respectively, was carried out. The results showed that lower concentration polyclonal antisera caused by two artificial antigen were all emerged in rabbits, the antisera could not be tested by agar double-diffusion method, but the antisera could be tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the more the number of boosted times, the higher the antisera titer.

Key words: botanical insecticide; Celangulin V; artificial antigen; immunogenicity