苦马豆素-HSA 对小鼠免疫原性研究

李 立,赵 俊,刘文明,童德文
(西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 【目的】研究苦马豆素-HSA(SW-HSA)对小鼠的免疫原性,为构建 SW 噬菌体单链抗体库奠定基础。【方法】将 12 只健康 Balb/c 小鼠随机分为小剂量免疫组(A 组)、大剂量免疫组(B 组)和对照组(C 组)3 组,每组 4 只。免疫组用 SW-HSA 加入佐剂后进行了 4 次免疫,首免和第 2 次免疫间隔 30 d,抗原剂量相同,分别为 A 组 0.05 mg/只,B 组 0.10 mg/只;第 3,4 次免疫分别在第 50,70 天进行,第 3 次免疫各组抗原量分别是首免的 1.5 倍,第 4 次免疫抗原量分别是首免的 2.5 倍。第 3,4 次免疫后第 10 天采血,用间接血凝试验与间接酶联免疫吸附试验检测血清中的 SW 抗体效价。【结果】第 4 次免疫后,间接血凝试验检测显示,A、B 两组小鼠血清中的抗体效价分别达 2^6 和 2^5;间接酶联免疫吸附试验检测显示,A、B 两组小鼠血清中的抗体效价分别达 2^9 和 2^8。【结论】用 SW-HSA 免疫 Balb/c 小鼠,可获得高抗体效价的免疫小鼠。

[关键词] 苦马豆素;SW-HSA;免疫原性
[中图分类号] S852.4+4 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2008)01-0023-05

Study on immunogenicity of swainsonine-HSA in mice

LI Li, ZHAO Jun, LIU Wen-ming, TONG De-wen
(*College of Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: 【Objective】 The immunogenicity of swainsonine-HSA was studied in mice to construct the phage antibody library against swainsoniene. 【Method】 12 health male Balb/c mice were divided into three groups. Group A (4 mice) was immunized with low-dose swainsonine-HSA, group B (4 mice) was immunized with high-dose swainsonine-HSA, group C (4 mice) was control. The mice of immune groups were injected four times by SW-HSA emulsified with CFA completely. At the first immunization, each mouse in group A was injected 0.05 mg swainsonine-HSA, 0.10 mg swainsonine-HSA for every mouse in group B. The second immunization was directed on the 30th day with SW-HSA emulsified by FIA after the first immunization. The immune doses and ways were same as the first time. The third immunization was done on the 50th day with SW-HSA emulsified by FIA. The immune way was the same as the first time, the dose of group A and group B was 1.5 times of the first immunization. The fourth immunization was done on the 70th day with SW-HSA dissolved by physiological saline, the immune way was subcutaneously of back and peritoneal injection, the dose of group A and group B were 2.5 times of the first immunization. 【Result】 The SW antibody titers were assayed by indirect hemagglutination test and enzyme-linked immunosorbentassay on day 10 after the third immunization and fourth immunization respectively. The results showed that, after the 4th immunization, the titers of the antibody against SW assayed by IHA were up to 2^6 in

* [收稿日期] 2007-01-25
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30371067);西北农林科技大学青年学术骨干支持计划项目(11241)
[作者简介] 李 立(1983—),女,宁夏吴忠人,在读硕士,主要从事动物病理学研究。
[通讯作者] 童德文(1967—),男,安徽太湖人,教授,博士生导师,主要从事动物病理学与毒理学研究。
E-mail:tdw4114@nwsuaf.edu.cn

group A and 2^5 in group B, the titers of the antibody assayed by ELISA were up to 2^9 in group A and 2^8 in group B.【Conclusion】 The mice that were immunized by swainsonine-HSA in the test have obtained high antibody titers.

Key words: swainsonine; SW-HSA; immunogenicity

免疫分析技术(Immunoassay, IA)是以抗原和抗体特异性结合反应为基础的分析技术,具有灵敏性高、特异性强、检测迅速和成本低廉等特点,在药物、毒素分析和环境污染物检测等领域得到了广泛应用。抗体作为各种免疫分析的核心试剂,对免疫分析的灵敏度、特异性等具有至关重要的作用[1]。大多数药物、毒素和环境污染物的分子质量小于1000 u,属于半抗原,可与其特异性抗体结合形成半抗原-抗体复合物,但是其本身并不具有免疫原性。利用此类半抗原与大分子质量载体偶联制备人工免疫原免疫动物,研制可溶性单链抗体,已在医学、免疫学和生物学等诸多研究领域显示出巨大的应用价值和潜力。

疯草的主要毒性成分苦马豆素(Swainsonine, SW),即 1,2,8-三羟基-八氢吲哚兹啶生物碱,是一种 α-甘露糖苷酶抑制剂[2-6]。免疫学研究认为,SW 分子质量小(173),为半抗原,不具有免疫原性。童德文等[7-8]将 SW 与大分子载体蛋白牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)偶联,然后用人工合成抗原 SW-BSA 免疫家兔,诱导产生了特异性抗体;董强等[9]用人工合成抗原 SW-BSA,制备成疫苗免疫山羊,诱导产生特异性抗体,延迟了山羊疯草的中毒时间。由此可见,对于小分子的 SW 来说,只要将其与载体化学合成为免疫原,就可能诱导特异性抗体的产生,使免疫学检测 SW 和防治家畜疯草中毒成为现实,但目前关于 SW 半抗原的免疫学研究工作仍处于探索阶段。本试验试图将人工合成抗原 SW-人血清白蛋白(SW-human serum albumin, SW-HSA)制成疫苗免疫 Balb/c 小鼠,并诱导小鼠产生高效价的 SW 抗体,从而为构建 SW 噬菌体单链抗体库以及免疫学检测 SW 和防治家畜疯草中毒奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 *试验动物* 12 只 4～6 周龄 Balb/c 雄性小鼠,购自第四军医大学实验动物中心。

1.1.2 *主要试剂与仪器* SW、SW-HSA,西北农林科技大学动物病理实验室提供;山羊抗小鼠 IgG-HRP,华美生物工程公司;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂,Sigma 公司;Tween-20,Amresco 公司;邻苯二胺(OPD),北京鼎国生物技术有限责任公司;DG-5031 型酶联免疫测定仪,国营华东电子管厂。

1.2 小鼠 SW-HSA 免疫

1.2.1 *抗原液的制备*[10-11] 精确称取 SW-HSA 溶解于一定体积的生理盐水中,加入等量佐剂混匀,至完全形成白色油包水型乳浊液。

1.2.2 *小鼠 SW-HSA 免疫*[12] 12 只 Balb/c 小鼠适应性饲养 1 周后,随机分为 3 组,即小剂量免疫组(A 组)、大剂量免疫组(B 组)和对照组(C 组),每组 4 只,各组小鼠分别编号为 1～4 号。试验共免疫 4 次:首次免疫时,用弗氏完全佐剂完全乳化 SW-HSA,A、B 组小鼠颈部两侧、背部皮下及后腿内侧 5 点注射,每点 0.04 mL,免疫剂量分别为 A 组 0.05 mg/只,B 组 0.10 mg/只;第 30 天进行第 2 次免疫,佐剂为弗氏不完全佐剂,A、B 组免疫途径、免疫剂量与首次免疫相同;第 50 天进行第 3 次免疫,方法同第 2 次免疫,A、B 组免疫剂量均为其首次免疫的 1.5 倍;第 70 天,用注射用生理盐水溶解 SW-HSA 进行第 4 次免疫,A、B 组免疫方法同上,免疫剂量均是首次免疫的 2.5 倍。具体免疫程序见表 1。在 A、B 组小鼠 4 次免疫的同时,C 组小鼠皮下注射等量生理盐水。

表 1 小鼠 SW-HSA 免疫的程序

Table 1 Immune time and the final concentration of antigens in immune poisoning A and B

免疫次数 Immune times	首次免疫后时间/d Day after the first immunization	免疫剂量/(mg·只$^{-1}$) Immune doses	
		A	B
1	0	0.050 0	0.100 0
2	30	0.050 0	0.100 0
3	50	0.075 0	0.150 0
4	70	0.112 5	0.225 0

1.3 小鼠血清制备

分别在第 3,4 次免疫后第 10 天,即免疫的第 60 和 80 天,小鼠断尾采血[13],分离血清并分装,−20 ℃保存,用于 SW 抗体检测。

1.4 小鼠 SW 抗体的检测

分别用间接血凝试验(Indirect hemagglutination test, IHA)和酶联免疫吸附试验(Enzyme-

linked immunosorbentassay,ELISA)检测小鼠血清中的 SW 抗体效价。

1.4.1　IHA 测定　参照文献[14-15],红细胞用 30 μg/L 的 SW 致敏,分别于血凝反应板第 1 行和第 2 行第 1～12 孔中以 25 μL/孔加入 pH 7.2 的 PBS;在反应板第 1,2 行首孔中加入 25 μL 待检血清,然后倍比稀释至第 9 孔,以第 10～12 孔为对照;第 1 行的各孔中加入 SW 致敏红细胞液(25 μL/孔),第 2 行的各孔中加入对照红细胞液(25 μL/孔)。将血凝反应板振摇 3～5 min 后,置于 37 ℃恒温箱中,1 h 后观察结果。

1.4.2　ELISA 测定[15-16]　用 SW 以 50 μL/孔包被酶标板(0.4 mg/mL),共 11 孔,第 12 孔加包被液作空白对照,置 4 ℃包被过夜;弃去孔内抗原溶液,用含体积分数 0.05%的 Tween-20、pH 7.2 的 PBS 洗酶标板 3 次,每次 3 min,甩干,每孔加 100 μL 50 mg/mL 脱脂奶粉液,37 ℃封闭 1 h;洗涤同上,各行 1～10 分别加入 50 μL pH 7.2 的 PBS,每行首孔加入 50 μL 待检血清,然后倍比稀释至第 10 孔,第 11 孔加入对照组小鼠血清作阴性对照,37 ℃孵育 1.5 h;洗涤,加入 1∶1000 稀释的羊抗小鼠 IgG-HRP,50 μL/孔,37 ℃孵育 1 h;洗涤,每孔加新配制的底物液 100 μL(0.4 mg/mL OPD),37 ℃避光作用 15 min;加入终止液(2 mol/L H_2SO_4),50 μL/孔,静置 3 min,490 nm 波长下测定 OD 值,计算 P/N 值(其中 P 为样品的 OD 值,N 为阴性孔样品的 OD 值),$P/N>2.1$ 判为阳性。

2　结果与分析

2.1　小鼠 SW 抗体的 IHA 检测

小鼠 SW 抗体的 IHA 检测结果见表 2。由表 2 可以看出,小鼠第 3 次免疫后第 10 天,免疫 A 组和 B 组都产生了 SW 抗体,抗体效价分别为 2^2,2^1,2^2,2^2 和 2^3,2^2,2^2,2^2;第 4 次免疫后第 10 天,A 组和 B 组的抗体效价分别为 2^7,2^6,2^6,2^6 和 2^6,2^5,2^5,2^5。可见,第 4 次免疫的抗体效价较第 3 次升高,且 A 组的抗体效价高于 B 组。

表 2　小鼠 SW 抗体的 IHA 检测

Table 2　Indirect hemagglutination test results of antibody against SW

组别 Group	小鼠编号 Number	血样 Sample	抗体效价 Antibody titers							
			2^1	2^2	2^3	2^4	2^5	2^6	2^7	2^8
A	1	a	+++	++	−	−	−	−	−	−
		b	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	−
	2	a	++	−	−	−	−	−	−	−
		b	++++	++++	++++	+++	++	++	−	−
	3	a	++	++	−	−	−	−	−	−
		b	++++	++++	++++	+++	++	++	−	−
	4	a	++	++	−	−	−	−	−	−
		b	++++	++++	++++	+++	++	++	−	−
B	1	a	+++	++	++	−		−−	−	−
		b	++++	++++	++++	+++	++	++	−	−
	2	a	+++	++	−	−	−	−	−	−
		b	++++	++++	+++	+++	++	−	−	−
	3	a	++	++	−	−	−	−	−	−
		b	++++	++++	+++	+++	++	−	−	−
	4	a	+++	++	−	−	−	−	−	−
		b	++++	++++	++++	+++	++	−	−	−

注:a 表示第 3 次免疫后第 10 天的血样,b 表示第 4 次免疫后第 10 天的血样。下表同。

Note:"a" represents the blood sample after the thrid immunization,"b" represents the blood sample after the forth immunization. The same as the following table.

2.2　小鼠 SW 抗体的间接 ELISA 检测

小鼠 SW 抗体的间接 ELISA 检测结果见表 3。由表 3 可以看出,小鼠第 3 次免疫后第 10 天,A、B 组小鼠的抗体效价分别为 2^6,2^5,2^5,2^6 和 2^7,2^6,2^6,2^6;第 4 次免疫后的第 10 天,A、B 组小鼠的抗体效价分别为 2^{10},2^9,2^{10},2^9 和 2^9,2^8,2^8,2^8。与第 3 次免疫结果相比,第 4 次免疫后 A、B 两组小鼠的抗体效价均明显升高。

表 3 小鼠 SW 抗体的间接 ELISA 检测

Table 3 ELISA results of antibody against SW

组别 Group	小鼠编号 Number	血样 Sample	抗体效价(P/N)/Antibody titres									
			2^1	2^2	2^3	2^4	2^5	2^6	2^7	2^8	2^9	2^{10}
A	1	a	5.135	5.046	4.496	4.018	3.918	2.305	1.923	1.337	0.273	0.195
		b	5.486	4.942	4.353	4.206	4.112	3.705	3.647	2.359	2.275	2.147
	2	a	5.118	4.828	3.946	3.246	3.118	1.891	1.764	1.450	0.423	0.214
		b	4.911	4.706	4.618	4.529	4.441	4.294	3.810	3.702	2.320	2.054
	3	a	5.336	5.109	4.646	4.222	3.664	2.350	1.659	1.237	0.546	0.255
		b	5.432	5.224	4.892	4.230	3.576	3.305	3.112	2.724	2.576	2.110
	4	a	5.321	5.210	4.986	4.210	3.765	2.432	2.012	1.982	0.820	0.625
		b	5.623	5.231	4.986	4.620	3.963	3.624	2.965	2.716	2.354	1.913
B	1	a	4.253	3.191	3.060	2.887	2.762	2.613	2.470	1.357	0.357	0.207
		b	4.286	3.650	3.462	3.412	2.665	2.346	2.250	2.212	2.157	1.912
	2	a	5.423	5.110	4.821	4.520	3.700	2.918	1.997	1.766	0.560	0.349
		b	5.122	4.400	3.979	3.436	2.607	2.525	2.329	2.115	1.422	1.200
	3	a	4.011	3.765	3.110	2.913	2.686	2.175	1.918	1.542	0.491	0.364
		b	4.736	4.100	3.622	2.900	2.847	2.743	2.513	2.303	1.863	1.765
	4	a	4.889	3.862	3.287	2.986	2.536	2.113	1.956	1.536	1.121	0.771
		b	5.198	4.896	4.296	3.956	3.628	3.086	2.751	2.421	2.012	1.986

3 讨 论

国外已有关于用小分子植物毒素与大分子载体蛋白偶联后免疫动物、4 诱导机体产生特异性抗体的相关报道。Pass 等[17]将马缨丹毒素 A 和 B 连接到 BSA 上免疫绵羊和牛,结果表明都产生了高滴度抗体。Payne 等[18]将拟茎点霉素与大分子载体结合后免疫绵羊,也诱导出了特异性抗体,动物攻毒试验获得成功。SW 属于半抗原,不具有免疫原性,国内童德文等[8]、董强等[9]将 SW 与 BSA 结合,合成了人工抗原 SW-BSA,并制成疫苗免疫动物,诱导机体产生了特异性抗体。

本试验将 SW-HSA 制成疫苗免疫 Balb/c 小鼠,结果表明于第 3 次免疫后,小鼠产生了 SW 特异性抗体;由于小鼠个体之间的差异,SW-HSA 对小鼠的免疫原性表现得不尽相同。间接血凝试验法测定结果表明,A 组小鼠的抗体效价分别为 2^2,2^1,2^2,2^2,B 组分别为 2^3,2^2,2^2,2^2;间接 ELISA 测定结果表明,A 组的抗体效价分别为 2^6,2^5,2^5,2^6,B 组分别为 2^7,2^6,2^6,2^6。第 4 次免疫后,A、B 两组小鼠的抗体效价都有明显上升,间接血凝试验法测定结果表明,A 组小鼠的抗体效价分别为 2^7,2^6,2^6,2^6,B 组分别为 2^6,2^5,2^5,2^5;间接 ELISA 测定结果表明,A 组小鼠的抗体效价分别为 2^{10},2^9,2^{10},2^9,B 组分别为 2^9,2^8,2^8,2^8。

半抗原不能与其抗体形成大分子免疫复合物,其与抗体形成的小分子免疫复合物难以用常规方法进行检测,考虑到人工抗原免疫动物后有大量抗载体抗体存在,因此不能用免疫用人工抗原检测是否有抗半抗原抗体产生及其效价的高低。为此,按照文献[16]的检测方法,本试验采用了 IHA 方法和间接 ELISA 方法检测抗体效价,结果表明两种方法都可以检测到抗体,只是后者的敏感性稍强。间接血凝试验(IHA)是根据红细胞表面的吸附抗原或抗体原理建立起来的,是一种灵敏性很高的抗原抗体检测方法,在试验中,能否克服红细胞自凝并成功制备致敏红细胞是试验的关键。本试验按照文献[14]和[16]所述方法,将 SW 半抗原结合在健康绵羊红细胞上检测小鼠血清中的 SW 抗体效价,结果显示,SW 半抗原直接致敏绵羊红细胞是成功的。检测结果表明,第 3 次免疫后 B 组抗体效价高于 A 组,第 4 次免疫后 A 组抗体效价高于 B 组,这可能因为 B 组的免疫剂量较大,经过多次免疫后小鼠对 SW-HSA 产生了免疫耐受。在用间接 ELISA 检测时,由于酶的催化频率较高,其可极大地放大反应效果,因此敏感度很高,试验中采用间接 ELISA 方法 2 次检测了抗体效价,结果表明其与 IHA 法的测定结果基本一致。

本试验将 SW-HSA 人工合成抗原制成疫苗免疫 Balb/c 小鼠,通过 IHA 和 ELISA 方法测定了 SW 抗体,获得了高抗体效价的免疫小鼠,为 SW 单链抗体的制备奠定了基础。

[参考文献]

[1] 陈新建,陈梅英,赵会杰. 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,1998:12-14.
Chen X J, Chen M Y, Zhao H J. Application of immunological

technology in botany[M]. Beijing:China Agricultural University Press,1998:12-14. (in Chinese)

[2] Colegate S M,Dorling P R,Huxtable C R. A spectroscopic investigation of swainsonine:an α-mannosidase inhibitor isolated from swainsonina cancens[J]. Australia Journal Chemistry,1979,32:2257-2264.

[3] Tulsiani D R P,Broquist H P,James L F,et al. The similar effects of swainsonine and locoweed on tissue glycosidases and oligosaccharides of the pig indicate that the alkaoids the principle toxin responsible for the induction of locoism[J]. Arch Biochem Biophys,1984,232:76-85.

[4] Molyneux R J,James L F,Panter K E,et al. Analysis and distribution of swainsonine and related polydroxyindolizidine alkaloids by layer chromatography[J]. Phytochenical Analysis,1991,2:125-129.

[5] 曹光荣,李绍君,段得贤,等. 黄花棘豆有毒成分的分离与鉴定[J]. 西北农业大学学报,1989,17(3):1-7.
Cao G R,Li S J,Duan D X. The isolation and identification of toxic componets from oxytropis Ochrocephala[J]. Acta Universitatis Agriculturalis Boreali-Dccidentalis,1989,17(3):1-7. (in Chinese)

[6] 黄有德,肖志国,孟聚诚,等. 变异黄芪有毒成分的分离与分析[J]. 中兽医医药杂志,1992(4):3-6.
Huang Y D,Xiao Z G,Meng J C,et al. Isolation and identification of poisonous constituent from *Astragalus variabilis* Bunge [J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine,1992(4):3-6. (in Chinese)

[7] 童德文,曹光荣,程东亮. 苦马豆素-BSA 的合成研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2001,29(4):9-12.
Tong D W,Cao G R,Chen D L. Study on synthesis of swainsonine-BSA[J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry:Natural Science Edition,2001,29(4):9-12. (in Chinese)

[8] 童德文,陈德坤,曹光荣. 苦马豆素-BSA 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):11-13.
Tong D W,Chen D K,Cao G R. Study on immunogenicity of swainsonine-BSA[J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry:Natural Science Edition,2001,29(5):11-13. (in Chinese)

[9] 董　强,童德文,付广建,等. 苦马豆素人工抗原免疫山羊的安全性试验[J]. 中国畜牧杂志,2005,41(5):18-20.
Dong Q,Tong D W,Fu G J,et al. Safety evaluation of artificial antigen for swainsonine in immunized goats[J]. Chinese Journal of Animal Science,2005,41(5):18-20. (in Chinese)

[10] 刘玉斌,苟仕金. 动物免疫学实验技术[M]. 长春:吉林科学技术出版社,1989.
Liu Y B,Gou S J. Animal immunity technology[M]. Changchun:Jilin Science Press,1989. (in Chinese)

[11] 朱　平,冯书章. 抗体实验技术[M]. 长春:长春出版社,1994.
Zhu P,Feng S Z. Experrimental technology of antibody[M]. Changchun:Changchun Press,1994. (in Chinese)

[12] 陈德坤. 己烯雌酚免疫分析的研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2004.
Chen D K. Studies on immunoassay of diethylstilbestrol[D]. Yangling,Shaanxi:Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry,2004. (in Chinese)

[13] 王廷华,李官成. 抗体理论与技术[M]. 北京:科学出版社,2005.
Wang T H,Li G C. Theories and techniques of antibody[M]. Beijing:Science Press,2005. (in Chinese)

[14] 刘湘新,程天印,刘进辉,等. 抗猪链球菌病高免卵黄抗体的研制[J]. 中兽医医药杂志,2004(6):49-50.
Liu X X,Cheng T Y,Liu J H,et al. Preparation of highly immunized egg yolk antibodies against pig streptococcicosis[J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine,2004(6):49-50. (in Chinese)

[15] 白文彬,于康震. 动物传染病诊断学[M]. 北京:中国农业出版社,2002.
Bai W B,Yu K Z. The diagnostic of animal infectious disease [M]. Beijing:China Agricultural Press,2002. (in Chinese)

[16] 童德文. 苦马豆素-BSA 的合成及其免疫原性研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2000.
Tong D W. Studies on synthesis og swainsonine-BSA and its immunogenicity[D]. Yangling,Shaanxi:Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry,2000. (in Chinese)

[17] Pass M A,Stewart C. Immunisation against lantana toxins [M]//James L F. Plant Toxicology. America:Iowa State University Press,1992:443-447.

[18] Payne A L,Than K A,Stewart P L,et al. Vaccination against lupinosis[M]//James L F. Plant Toxicology. America:Iowa State University Press,1992:234-238.