

山羊血清中 CD58 间接竞争 ELISA 检测方法的建立

高纪振,周丽梅,王爱华,靳亚平,宋毓民,吴庆侠

(西北农林科技大学 动物医学院 农业部家畜生殖内分泌与胚胎工程重点开放性实验室,陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**制备抗 CD58 单克隆抗体,在此基础上建立可用于定量检测山羊血清中 CD58 含量的间接竞争 ELISA 方法。**【方法】**以纯化的 CD58 蛋白为抗原免疫 BALB/c 小鼠,通过杂交瘤细胞融合技术制备抗 CD58 单抗,并对其特异性进行鉴定;在此基础上,建立 CD58 间接竞争 ELISA 检测方法,对不同生理时期山羊血清中 CD58 的含量进行检测。**【结果】**筛选出 1 株稳定分泌抗 CD58 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 G6;玫瑰花环抑制试验和 Western-blotting 试验表明,制备的细胞株能分泌针对 CD58 的特异性单克隆抗体;对间接竞争 ELISA 方法的反应条件进行优化后,建立了检测 CD58 的间接竞争 ELISA 方法,该方法最适可测范围为 $10 \sim 1\,000\,000$ ng/mL,理论最低检测限为 3.087 ng/mL,批内和批间平均变异系数分别为 3.50% 和 5.22%;用建立的方法检测未发情和发情山羊血清中 CD58 含量分别为 (32.160 ± 3.69) 和 (35.929 ± 3.08) $\mu\text{g/mL}$,怀孕山羊血清中 CD58 含量为 (61.564 ± 5.10) $\mu\text{g/mL}$ 。**【结论】**建立了山羊血清中 CD58 间接竞争 ELISA 检测方法,该方法敏感、特异,具有良好的重复性;对不同生理时期山羊血清中 CD58 含量的检测表明,怀孕山羊血清中 CD58 含量显著高于未发情和发情山羊。

[关键词] CD58 蛋白;单克隆抗体;间接竞争 ELISA 方法

[中图分类号] S858.274.4⁺3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)08-0025-06

Development of a McAb-based indirect competitive ELISA for the detection of CD58 in goat serum

GAO Ji-zhen, ZHOU Li-mei, WANG Ai-hua, JIN Ya-ping, SONG Yu-min, WU Qing-xia

(Key Laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryo Engineering of Agriculture Ministry of
China, College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The study was done to develop an indirect competitive ELISA method for the quantitative determination of CD58 in goat serum by preparation of the anti-CD58 monoclonal antibody. **【Method】** The CD58 protein was immunized to BALB/c mice to prepare the specific monoclonal antibody against CD58 by hybridoma technique. On this basis, goat serum contents of CD58 at different physiological periods were detected through the establishment of an indirect competitive ELISA method. **【Result】** One clone of the hybridoma cell stably secreting anti-CD58 antibody was obtained and named G6. This monoclonal antibody could react to CD58 protein in Et-rosetting inhibition test, as well as with CD58 in western-blotting. After optimization of the reactive condition, the method of indirect competitive ELISA for detection of CD58 was established. The optimal detection range was $10 - 1\,000\,000$ ng/mL, providing the detection limit of 3.087 ng/mL in theory. Meanwhile, the coefficient of variation of intra- and inter-assays was 3.50% and 5.22% respectively. The results of samples showed that the content of CD58 in not estrus and estrus goat serum was (32.160 ± 3.69) and (35.929 ± 3.08) $\mu\text{g/mL}$ respectively, and the content of CD58 in pregnant goat serum was (61.564 ± 5.10) $\mu\text{g/mL}$. **【Conclusion】** The indirect competitive

* [收稿日期] 2008-12-09

[基金项目] 西北农林科技大学青年骨干教师支持计划项目(01140305)

[作者简介] 高纪振(1981—),男,河南辉县人,在读硕士,主要从事家畜生殖内分泌研究。E-mail: hxyzgjz@163.com

[通信作者] 靳亚平(1966—),男,陕西宝鸡人,教授,博士生导师,主要从事家畜生殖内分泌研究。E-mail: yapingjin@163.com

ELISA detection method of CD58 of goat serum was established. This method is sensitive, specific and has high consistency with CD58 detection. Testing CD58 of goat serum during different physiological periods showed that the CD58 of goat serum of pregnant goat were significantly higher than those of non-estrus and estrus goat.

Key words: CD58 protein; monoclonal antibody; indirect competitive ELISA

细胞分化抗原 58(CD58, LFA-3)的分子质量为 55~70 ku, 广泛分布于机体多种有核和无核细胞表面^[1]。CD58 除了在免疫方面具有重要作用外^[2-3], 其单独作用能使子宫内膜淋巴细胞(EML)活化, 能与植物血凝素(PHA-P)协同作用而激活 EML, 并且与孕酮和雌激素等物质共作用, 以不同方式影响妊娠期 EML 的活化与分泌, 对早期胚胎发育和动物的正常妊娠具有重要作用^[4-6], 这提示 CD58 对妊娠期子宫局部细胞因子的网络形成及调节具有潜在影响。但是, 目前对 CD58 在妊娠期子宫局部发挥作用的机理, 及动物血清中 CD58 在不同生理时期是否存在数量上的明显变化, 尚无相关报道。

目前, 对 CD58 的测定仍然沿用玫瑰花环抑制试验, 这种方法虽灵敏度高, 无需昂贵的仪器设备, 但却具有耗时费工、变异性大、一次测定样品少等缺点, 所以不能作为常规方法在生产中广泛应用。鉴于此, 本试验通过制备 CD58 单抗, 建立了检测山羊血清中 CD58 含量的间接竞争 ELISA 方法, 以为研究 CD58 在妊娠期子宫局部发挥功能的作用机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 BALB/c 小鼠 3 只、昆明系小鼠 6 只(用于制备饲养层细胞), 购自第四军医大学实验动物中心; 绵羊 1 头, 由西北农林科技大学实验动物中心提供; 仔猪 1 头, 购自杨凌集贸市场。试验动物均为雌性, 临床检查健康, 饲养于西北农林科技大学实验动物中心。

1.1.2 山羊血样的采集 关中奶山羊 4 只, 购自杨凌奶山羊养殖户, 均为当年青年母羊。颈静脉采集未发情、发情后 24 h 和配种后 20 d 关中奶山羊血样, 10 mL/只, 室温静置析出血清, 0.5 mL 分装, -20℃保存备用。

1.1.3 主要试剂 1%绵羊红细胞悬液(SRBC)、猪外周血单个核细胞(PBMC)、CD58 蛋白均参照靳亚平等^[7]的方法制备; SP2/0 骨髓瘤细胞由第四军医大学免疫实验室提供; 中分子质量预染蛋白 Marker

购自西安舟鼎国生物技术有限责任公司; DMEM、HAT 和 HT 培养基购自 Sigma 公司; 辣根过氧化物酶羊抗鼠 IgG 购自北京中山试剂公司; 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)和 PEG-4000 购自 merck 公司; 新生牛血清购自郑州佰安试剂公司; 淋巴细胞分离液购自 Sigma 公司, 比重(1.077±0.002) g/L; 福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂由西北农林科技大学家畜生殖内分泌与胚胎工程实验室制备。

1.1.4 主要仪器 CO₂ 培养箱(TE-HER Water-Jackat), 洁净工作台(北京半导体设备一厂), 生物倒置显微镜(Conic XDS-1B), 酶标分析仪(SUN-RISE), 电子分析天平(Denver), 低温高速离心机(德国 Hermle 公司), 普通离心机(北京医疗仪器厂), 微量可调移液器(NICHIRYO), 酶标板(96 孔, Costar)。

1.2 CD58 单克隆抗体的制备与鉴定

1.2.1 单克隆抗体的制备 将 800 μg/mL 的 CD58 蛋白分别与福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂按 1:1 的体积比乳化后免疫 BALB/c 小鼠, 0.2 mL/只, 每隔 14 d 免疫 1 次。待小鼠血清抗体水平达到要求后, 取小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞用 PEG4000 融合, 然后用 CD58 蛋白做抗原进行间接 ELISA 试验, 筛选阳性细胞, 用有限稀释法进行克隆, 最后筛选出稳定分泌抗 CD58 抗体的杂交瘤细胞株。将杂交瘤细胞注入小鼠腹腔制备腹水单抗, 用 CD58 蛋白包被酶标板, 间接 ELISA 试验测定腹水单抗效价^[8]。

1.2.2 单克隆抗体亲合力常数的测定 分别用 20, 10 和 5 μg/mL CD58 蛋白包被酶标板, 将腹水单抗用稀释液稀释为 1:10¹, 1:10², ……, 1:10¹⁰ (体积比)共 10 个不同稀释度, 进行间接 ELISA 试验。以 OD₄₅₀ 值为纵坐标, 抗体稀释倍数的负对数 (-lgα) 为横坐标, 绘制不同浓度的包被抗原反应曲线, 以曲线上部趋于平坦的 OD₄₅₀ 值为 100%, 查出 OD₄₅₀ 值为 50% 时的单抗浓度, 参考文献[9]的方法计算抗体亲合力常数(K_{aff})。

1.2.3 单克隆抗体特异性的鉴定 (1)玫瑰花环抑制试验鉴定单抗与 CD58 蛋白反应的特异性。将腹

水单抗按 1:1 000 (体积比)稀释后,参考文献[10]的方法进行试验。将 1%绵羊红细胞(SRBC)悬液加入 8 支小试管,每管 0.1 mL,然后将其分为试验组与对照组,每组 4 支试管。试验组每管加入 CD58 单抗 0.1 mL,对照组每管加等量 RPMI 1640 培养液。将各组试管内液体混匀后于室温(20~22 ℃)作用 30 min,加入用等量 1%绵羊红细胞悬液吸收过的牛血清 5 mL,1 000 r/min 离心 10 min,吸弃上清,用 RPMI 1640 培养液使每管恢复至约 0.1 mL,再加入 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的猪外周血单个核细胞(PBMC)0.1 mL,37 ℃水浴 5 min,取出于 4 ℃静置过夜,加 0.8%戊二醛 1 滴(约 0.025 mL),轻轻捻转试管,使管底细胞混悬,室温作用 10 min 后推片,瑞特氏染色,显微镜下每个试管计数 200 个视野,按下式计算玫瑰花结抑制率:

玫瑰花结抑制率/%=((对照组花结形成率-试验组花结形成率)/对照组花结形成率)×100%。

(2)Western-blotting 试验鉴定单抗与 CD58 蛋白的反应性。参照文献[11]进行,按常规方法配制 12%分离胶,5%浓缩胶,用加样缓冲液将 CD58 配制成 1 mg/mL 的样品,进行 SDS-PAGE 后,转移至 PVDF 膜上,用含 1% BSA 的 TBSA 于 37 ℃封闭 2 h。将 PVDF 膜分别与 1:1 000 (体积比)稀释的 CD58 腹水单抗和工作浓度为 1:32 000 的羊抗鼠 IgG-HRP 反应,经孵育和充分洗涤后加入 DAB 显色液,终止反应后摄像。

1.3 包被抗原与腹水抗体工作浓度的测定

参考文献[12]进行。用方阵法确定包被抗原和腹水抗体的最佳工作浓度,分别用 10 和 5 $\mu\text{g/mL}$ 的 CD58 包被酶标板,每孔加 100 μL ,37 ℃孵育 2 h,弃去孔内液体,将 PBS 与 5 mL/L Tween-20(PBST)混合液加入酶标板中,静置 3 min,弃去液体,如此洗涤 3 次(以下简称洗涤);每孔加 1.0%的明胶 100 μL 封闭,37 ℃温箱放置 1 h 后洗涤;将腹水单克隆抗体作 1:100,1:500,1:1 000,1:2 000 和 1:4 000 (体积比)稀释后,每孔加入 100 μL ,37 ℃温箱放置 1 h 后洗涤;每孔加入 1:32 000 二抗 100 μL ,37 ℃温箱放置 1 h 后洗涤;加入新鲜配制的 TMB-H₂O₂ 底物液 100 μL /孔,37 ℃作用 30 min;按 50 μL /孔加 2 mol/L 硫酸终止液,15 min 内用酶标仪于波长 450 nm 处测定 OD₄₅₀ 值。最后选择 OD₄₅₀ 值为 1.0 左右的稀释倍数作为抗原和腹水抗体理想的工作浓度。

1.4 山羊血清中 CD58 间接竞争 ELISA 检测方法的建立

1.4.1 标准曲线的制作 用 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液将 CD58 配成 0,10,100,1 000,5 000,10 000,50 000,100 000,500 000 和 1 000 000 ng/mL 的标准使用液,进行间接竞争 ELISA 试验。以 B/B_0 (B 为不同浓度 CD58 标准液的 OD₄₅₀ 值, B_0 为零浓度标准液的 OD₄₅₀ 值)为纵轴,以 CD58 标准液浓度的对数值($\lg[C]$)为横轴,绘制标准曲线。

1.4.2 灵敏度的测定 做标准曲线的同时,在一块包被好的酶标板上随机选择 10 个孔做零标准品间接竞争 ELISA 检测。求所得 10 个 OD₄₅₀ 值的平均值($\overline{\text{OD}}_{450}$)和标准差(SD),按照下式计算灵敏度(Y): $Y = [(\overline{\text{OD}}_{450} - 2\text{SD})/\overline{\text{OD}}_{450}] \times 100\%$ 。将 Y 值代入标准曲线回归方程,计算出对应的 CD58 质量浓度,即为该方法理论上的检测下限。

1.4.3 精密度的测定 (1)批内误差。每一个标准品浓度设 4 个重复,重复 1.4.1 的操作。以其批内变异系数(CV)表示批内误差。 $\text{CV}/\% = (\text{SD 的均值}/\text{平均批内结合率}) \times 100\%$ 。

(2)批间误差。以其批间变异系数表示。分别于 8:00,13:00,18:00 重复 1.4.1 的操作,先求出 3 块板各浓度的板间变异系数,再求其平均值即为批间变异系数。

1.5 山羊血清中 CD58 含量的测定

1.5.1 待检山羊血清的处理 将采集血样的关中奶山羊按 1,2,3,4 编号,然后用制备的山羊血清与 1%绵羊红细胞悬液等体积混匀,以吸收山羊血清中的 CD2,37 ℃作用 30 min,2 000 r/min 离心 10 min,吸取上清,0.5 mL 分装,-20 ℃保存备用。

1.5.2 山羊血清中 CD58 含量的测定 按本试验 1.3 中确定的条件,将 CD58 稀释至工作浓度后包被酶标板,37 ℃孵育 2 h,洗涤 3 次(以下简称洗涤);加 1.0%的明胶 100 μL 封闭,37 ℃温箱放置 1 h 后洗涤;将 1.5.1 中制备的待检山羊血清与腹水抗体等体积混合,37 ℃孵育 30 min 后,每孔加入 100 μL ,37 ℃温箱放置 1 h 后洗涤;每孔加入 1:32 000 二抗 100 μL ,37 ℃温箱放置 1 h 后洗涤;加入新鲜配制的 TMB-H₂O₂ 底物液 100 μL /孔,37 ℃作用 30 min,按每孔 50 μL 加 2 mol/L 硫酸终止液,15 min 内用酶标仪于波长 450 nm 处测定 OD₄₅₀ 值。代入 1.4.1 所求得的回归方程计算山羊血清中的 CD58 含量。

1.6 数据统计分析

用 SPSS11.5 对 1.2.3 中(1)的玫瑰花环抑制试验和 1.5.2 的山羊血清中 CD58 含量检测数据进行统计分析,判断是否存在显著差异。

2 结果与分析

2.1 CD58 单抗制备与特性鉴定

2.1.1 单抗制备 通过细胞融合与克隆筛选出 1 株稳定分泌 CD58 抗体的杂交瘤细胞株 G6,经间接 ELISA 方法测定,用其制备的小鼠腹水效价为 1 : 10⁵。

2.1.2 单抗亲合力常数的测定 由图 1 可以看出,当 CD58 蛋白质量浓度为 20,10 和 5 μg/mL 时,其曲线部分均在第 5 个稀释度趋于平坦,计算出 50% OD₄₅₀ 值所对应的腹水单抗稀释浓度后带入公式得出 3 个 K_{aff} 值,求其平均数得出由 G6 株细胞所获得的腹水单抗的亲合力常数为 K_{aff}=(1.07±0.04)×

10⁸ mol/L,与 CD58 具有较高的亲和力。

2.1.3 单抗的特异性鉴定 腹水单抗的玫瑰花环抑制试验结果见表 1,可知其对玫瑰花环形成的抑制率达到(59.14±2.68)%。分析显示,试验组花环形成率极显著低于对照组(P<0.01),说明所制备的抗 CD58 单抗能够封阻 CD58 与 CD2 的结合。

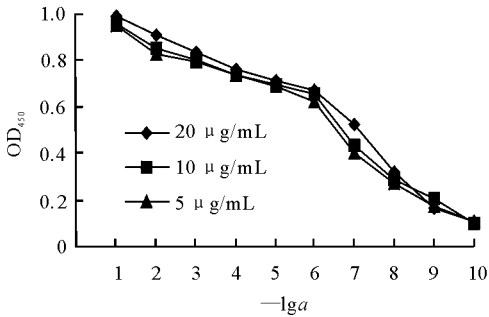


图 1 G6 单抗亲和力常数测定结果
Fig. 1 Determined results of G6 McAb's affinity constant

表 1 玫瑰花环试验结果
Table 1 Erythrocyte rosette test results

组 别 Group		1	2	3	4	$\bar{X} \pm SD$
试验组花结形成率	Et formation rate of test group	18.50*	16.50*	19.50*	21.00*	18.88±1.89*
对照组花结形成率	Et formation rate of control group	47.00	43.50	46.00	48.00	46.13±1.93
抑制率	Inhibition rate	60.64	62.07	57.61	56.25	59.14±2.68

注: * 表示与对照组相比差异显著(P<0.01)。
Note: Significant difference compared with the control group (P<0.01).

Western-blotting 试验结果见图 2,可见在目的条带(约 70 ku)处出现 1 条特异性反应带,大小与 CD58 蛋白的 SDS-PAGE 电泳带相同,说明单抗与 CD58 蛋白发生了特异性反应。

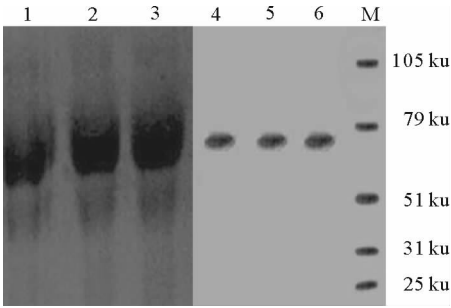


图 2 CD58 单克隆抗体与 CD58 蛋白的 Western-blotting 反应结果
1~3. CD58 的 SDS-PAEG 电泳条带;4~6. 相应的 Western-blotting 检测条带;M. 蛋白 Marker

Fig. 2 Western-blotting detection of McAbs with CD58 protein
1-3. The electrophoresis of CD58 by SDS-PAEG;4-6. McAbs against CD58 by Western-blotting;M. Protein Marker

2.2 包被抗原与腹水抗体工作浓度的测定

从表 2 可以看出,OD₄₅₀ 值接近 1.0 时的 CD58 蛋白质量浓度有 5 和 10 μg/mL,腹水单抗的稀释度有 1 : 500 和 1 : 1 000。从节省腹水抗体和 P/N 值考虑,以 10 μg/mL 作为包被抗原的工作质量浓度,1 : 1 000 作为腹水抗体的工作稀释度较为合适。

2.3 间接竞争 ELISA 标准曲线的建立

用间接竞争抑制性 ELISA 试验测得校正曲线(图 3),在 CD58 质量浓度为 10~1 000 000 ng/mL 时,回归方程为: y = -0.156 5x + 1.071 9, R² = 0.967 8。

2.4 CD58 间接竞争 ELISA 法灵敏度的确定

用间接竞争抑制性 ELISA 法检测 10 个空白标准品,求 y 值。结果显示, $\overline{OD}_{450}$ = 1.026 66,标准方差 SD = 0.002 458 5, Y = 99.52%。将 y 值代入回归方程,计算出在标准曲线上对应的 CD58 质量浓度为 3.087 ng/mL,即该方法的理论检测下限为 3.087 ng/mL。

表 2 抗 CD58 单抗和包被抗原最佳工作浓度的筛选结果

Table 2 Optimal concentration of mAb anti-CD58 ascites and coated antigen

CD58/(μg·mL ⁻¹)		不同腹水抗体稀释度的 OD ₄₅₀ 值 The OD ₄₅₀ of different dilution of antibody in hydroperitoneum				
		1:100	1:500	1:1 000	1:2 000	1:4 000
10	阳性 Positive	1.675	1.318	1.031	0.827	0.521
	阴性 Negative	0.083	0.085	0.081	0.079	0.083
	阳性/阴性 P/N	19.946	15.506	12.728	10.468	6.277
5	阳性 Positive	1.454	1.132	0.923	0.702	0.427
	阴性 Negative	0.081	0.080	0.079	0.082	0.080
	阳性/阴性 P/N	17.951	14.150	11.684	8.561	5.338

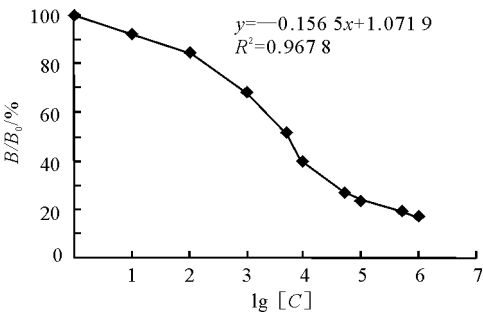


图 3 山羊血清中 CD58 含量检测标准曲线

Fig. 3 Detection standard curve of CD58 in goat serum

表 3 山羊血清中 CD58 的质量浓度

Table 3 Goat serum levels of CD58

生理时期 Physiological period		1	2	3	4	$\bar{X} \pm SD$
未发情	Interestrus	30.624 a	37.414 a	28.900 a	31.700 a	32.160±3.69 a
发情期	Estrus	32.888 a	40.180 a	35.812 a	34.836 a	35.929±3.08 a
怀孕	Pregnancy	61.806 b	68.396 b	9.296 b	56.758 b	61.564±5.10 b

注:同列数据后标不同字母者表示差异显著($P<0.05$)。

Note:Numbers within row with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

3 讨论

正常妊娠过程中,母体内存在 Th1/Th2 型细胞应答生理性失衡, Th2 型细胞因子占优势,抑制 Th1 型细胞因子的产生,使 Th1/Th2 型细胞因子之间的平衡向远离 Th1 型细胞因子的方向移动,使 Th2 型免疫优势随妊娠进展而不断得到强化,从而使母胎界面 Th1/Th2 型免疫平衡始终保持在最有利于妊娠维持的 Th2 型免疫偏离状态。Th1 细胞主要分泌干扰素- γ 、白细胞介素-2(IL-2)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等, Th2 细胞则主要分泌白细胞介素 4、6、10(IL-4、IL-6、IL-10)等^[13-14]。大量研究证实,IL-2 在妊娠免疫中主要参与母体对胎儿的免疫排斥反应,对妊娠的维持表现负调节作用,被称为是对妊娠维持有害的因子^[15]。但随着对 IL-2 功能研究的深入,发现适量的 IL-2 对胎儿的生长发育是必需的,它可活化 T 细胞,促使其产生粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等细胞因子,促进滋养层细胞分化,对受精卵着床等具有重要作用^[16]。同

2.5 CD58 间接竞争 ELISA 法精确度的确定

经测定,得出该方法的批内变异系数为3.50%。各质量浓度的批间变异系数为 2.01%~11.80%,平均为 5.22%,从批内和批间误差可以看出,本方法具有良好的重复性。

2.6 山羊血清中 CD58 的测定

对不同生理时期山羊血清中 CD58 含量进行检测分析,结果(表 3)显示,未发情山羊与发情山羊血清中 CD58 质量浓度没有明显差异,而两者均与怀孕山羊有显著差异($P<0.05$)。

时,IL-2 亦可促进细胞周期相关因子(CDt)活化增殖,分泌转移性生长因子-beta(TGF-B)而在妊娠维持中发挥作用^[17],并可刺激子宫蜕膜中抑制性 T 细胞的增殖,对抑制母体免疫排斥有一定作用。体外培养表明,通过 CD58 可活化 CD4⁺ T_{EM},促其分泌 IL-2,在同种异体移植排斥反应中起着重要作用,但随着剂量的增加,其效应反而会受到抑制^[18]。马勇江等^[19]证实,在山羊怀孕 20 d 左右,IL-2 的分泌明显增加,而后则显著下降;同时证明在整个妊娠过程中,IL-4 的分泌水平是持续增加的,而妊娠早期 IL-4 水平增加对动物正常妊娠维持起着重要作用。体外培养表明,随着 CD58 含量的增加,妊娠子宫局部 IL-2 的分泌会受到抑制,而 IL-4 的分泌则显著增加,表明 CD58 参与了 Th1-Th2 型细胞因子的调节,即强化了 Th2 型免疫优势,弱化了 Th1 型免疫。说明 CD58 在早期胚胎植入和维持动物的正常妊娠过程中起到了重要作用。

本试验对不同生理时期山羊血清中 CD58 的质量浓度进行了测定,结果显示,在妊娠 20 d 时血清

中 CD58 的质量浓度显著高于未发情和发情山羊 ($P < 0.05$), 证明 CD58 在山羊妊娠过程中发挥了一定的作用。但 CD58 质量浓度在山羊的整个妊娠过程中是如何变化的, 以及是否可以通过检测 CD58 来代替早孕因子 (EPF) 进行山羊的早孕诊断, 还需要进一步研究。

本试验通过 CD58 单抗的制备, 建立了检测山羊血清中 CD58 含量的间接竞争 ELISA 方法, 与传统检测 CD58 的玫瑰花环抑制试验相比, 该法具有特异性强、敏感性高、操作快速简便等特点, 为 CD58 的快速检测及其功能的进一步研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 窦永喜, 刘百林. CD58 免疫增强作用的研究 [J]. 甘肃畜牧兽医, 2001, 31(5): 3-4.
Dou Y X, Liu B L. Study on immunopotential effect of CD58 [J]. Gansu Animal and Veterinary Sciences, 2001, 31(5): 3-4. (in Chinese)
- [2] 陈德坤, 穆 杨, 郑增忍, 等. 猪红细胞 CD58 分子协同 NDIV 疫苗免疫的佐剂效应 [J]. 中国兽医学报, 2003, 23(6): 530-532.
Chen D K, Mu Y, Zheng Z R, et al. Vaccine adjuvant effects of CD58 from pig erythrocytes on ND IV strain inoculation [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2003, 23(6): 530-532. (in Chinese)
- [3] Fonseca A M, Pereira C F, Arosa F A. Red blood cells promote survival and cell cycle progression of human peripheral blood T cells independently of CD58/LFA-3 and heme compounds [J]. Cellular Immunology, 2003, 224(1): 17-28.
- [4] 沈文正, 靳亚平, 李引乾, 等. CD58、雌酮及孕酮对附植早期山羊 EML 的体外活化 [J]. 西北农业学报, 2002, 11(2): 1-4.
Shen W Z, Jin Y P, Li Y Q, et al. *In vitro* activation of goat uterus EML in early implantation by CD58, estrone and progesterone [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2002, 11(2): 1-4. (in Chinese)
- [5] 靳亚平, 王爱华, 王建辰, 等. CD58 对山羊外周血淋巴细胞 (PBL) 的活化作用 [J]. 中国兽医学报, 2002, 22(1): 50-52.
Jin Y P, Wang A H, Wang J C, et al. The vitro activation of CD58 on PBL in goat [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2002, 22(1): 50-52. (in Chinese)
- [6] 靳亚平, 王爱华, 肖俊杰, 等. CD 58 对猪 PBMC 转化的作用 [J]. 西北农业大学学报, 1998, 26(2): 62-65.
Jin Y P, Wang A H, Xiao J J, et al. Activation of pig PBMC induced by CD58 [J]. Acta Universitatis Agriculturae Boreali-occidentalis, 1998, 26(2): 62-65. (in Chinese)
- [7] 靳亚平, 王建辰, 王爱华. 山羊红细胞膜表面 CD58 的制备与鉴定 [J]. 动物医学进展, 2000, 21(2): 54-56.
Jin Y P, Wang J C, Wang A H. The preparation and identification of CD58 from goat RBC [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2000, 21(2): 54-56. (in Chinese)
- [8] 赵 萍, 储岳峰, 高鹏程, 等. 绵羊肺炎支原体间接 ELISA 检测方法的建立及应用 [J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2008, 37(5): 510-513.
- Zhao P, Chu Y F, Gao P C, et al. Establishment and application of indirect ELISA method for mycoplasma ovipneumoniae [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Natural Science Edition, 2008, 37(5): 510-513. (in Chinese)
- [9] 肖 毅, 梅其炳, 侯 颖, 等. 抗 PH2SA 单克隆抗体相对亲和力的测定 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(5): 657-660.
Xiao Y, Mei Q B, Hou Y, et al. Measurement of affinity constant of monoclonal antibodies to PH-SA [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2005, 21(5): 657-660. (in Chinese)
- [10] 沈文正, 靳亚平, 郭欣怡, 等. 山羊 CD58 的制备与活性检测 [J]. 甘肃畜牧兽医, 2002, 32(4): 2-3.
Shen W Z, Jin Y P, Guo X Y, et al. The preparation and detection activity of CD58 from goat [J]. Gansu Animal and Veterinary Sciences, 2002, 32(4): 2-3. (in Chinese)
- [11] 曹 亚. 实用分子生物学操作指南 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 267-270.
Cao Y. Practical molecular biology operation guide [M]. Beijing: People's Health Press, 2003: 267-270. (in Chinese)
- [12] Lee D N, Kuo T Y, Chen M C. Expression of porcine epidermal growth factor in Pichia pastoris and its biology activity in early-weaned piglets [J]. Life Science, 2006, 78: 649-654.
- [13] 王建辰, 章孝荣. 动物生殖调控 [M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1998: 47.
Wang J C, Zhang X R. Animal reproductive control [M]. Hefei: Anhui Science and Technology Press, 1998: 47. (in Chinese)
- [14] 杨汉春. 动物免疫学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1996: 95-101.
Yang H C. Animal immunology [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 1996: 95-101. (in Chinese)
- [15] 李国勤, 赵宝玉, 曹光荣. 白细胞介素对雌性动物生殖的调节 [J]. 动物医学进展, 1998, 19(4): 23-25.
Li G Q, Zhao B Y, Cao G R. Regulation of the animal reproduction by IL [J]. Progress in Veterinary Medicine, 1998: 19(4): 23-25. (in Chinese)
- [16] 马勇江, 靳亚平. 妊娠期子宫局部细胞因子网络 [J]. 西北农业大学学报, 2000, 9(6): 83-87.
Ma Y J, Jin Y P. The local-uterine cytokines network during pregnancy [J]. Acta Universitatis Agriculturae Boreali-occidentalis, 2000, 9(6): 83-87. (in Chinese)
- [17] Hansen P J, Wenjun L. Immunological aspects of pregnancy: Concepts and speculations using the sheep as a model [J]. Anim Reprod Sci, 1996, 42: 483.
- [18] Stephen L Shiao, Nancy C Kirkiles-Smith, Benjamin R Shepherd, et al. Human effector memory CD4 + T cells directly recognize allogeneic endothelial cells *in vitro* and *in vivo* [J]. The Journal of Immunology, 2007, 179: 4397-4404.
- [19] 马勇江, 靳亚平, 曹斌云, 等. CD58 对妊娠早期山羊子宫局部细胞因子的调节 [J]. 中国兽医学报, 2003, 23(1): 90-93.
Ma Y J, Jin Y P, Cao B Y, et al. Regulation of the local-uterine cytokines by CD58 during early pregnancy in goat [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2003, 23(1): 90-93. (in Chinese)