

抗猪瘟 IgY 的制备及临床应用初报

张振仓¹, 沈文正¹, 许信刚², 张国祥²

(1. 杨凌职业技术学院, 陕西杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学, 陕西杨凌 712100)

摘要: 应用合理的免疫程序, 用猪瘟抗原免疫蛋鸡, 并以水稀释法、聚乙二醇萃取法结合透析对所产蛋的卵黄部分进行处理, 成功地提取到抗猪瘟 IgY(SF-IgY), 获得率为 6.83mg/mL。该制剂纯度为 45.14%, 能中和 1000MID 猪瘟兔化种毒, 用于紧急治疗猪瘟后, 临床应用效果确实。

关键词: 猪瘟; IgY 提取; 中和试验; 临床应用

中图分类号: S852.5⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2003)03-0036-03

Preliminary Study on Preparation and Clinical Application of IgY against Swine Fever

ZHANG Zhen-cang¹, SHEN Wen-zheng¹, XU Xin-gang², ZHANG Guo-xiang²

(1. Yangling Vocational and Technical College, Yangling Shaanxi 712100, China; 2. Northwest Sci-Tech
University of Agriculture and Forestry, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: Layer hens were immunized with swine fever antigen under proper immunity schedule. The egg yolk was collected and tested after the treatments with water dilution, PGE extraction and dialysis. Then the IgY preparation against swine fever (SF-IgY) was successfully produced, with the purification degree of 45.14% and production rate of 6.83 mg/mL. The SF-IgY product could neutralize 1000MID Swine Fever virus hatched with rabbit and showed reliable effect in urgent clinical treatment against Swine Fever.

Key words: Swine fever; Preparation of IgY; Neutralization test; Clinical application

卵黄抗体(Immunoglobulin Yolk, IgY)制剂在哺乳动物体内不激活补体系统, 不发生交叉血清学反应^[1,2], 被证明是病毒性疾病的特异性免疫治疗剂。利用蛋鸡生产 IgY 具有提取成本低、产量多、纯度高等优点。20 世纪 90 年代以来, 国内外已采用水稀释法和聚乙二醇沉淀等方法提取并大量生产 IgY^[3~7], 对动物和人的多种疾病表现出明显的临床疗效^[3,8]。本实验旨在建立抗猪瘟卵黄抗体(SF-IgY)的制备方法, 为临床治疗猪瘟提供特异性免疫制剂。

1 材料和方法

1.1 试验材料

猪瘟活疫苗购于陕西维康生物发展有限公司

(批号 990628); 自制猪瘟甲醛灭活苗用石门系种毒由中监所提供, 本室保存。

1.2 蛋鸡的免疫

取 18 周龄尼克红蛋鸡分别后海穴注射猪瘟活疫苗(4 头份), 肌肉注射本室自制猪瘟灭活苗(1.5 mL); 免疫间隔 14d, 三免 10d 后开始收集免疫鸡蛋, 以后每隔一个月加强一次免疫^[3,4]。

1.3 SF-IgY 制备

参照文献^[4~7]联合应用水稀释法、聚乙二醇萃取法、透析方法制备, 100 万/L 加双抗(各 100 万/L)和硫柳汞(0.1g/L), 混合分装, 低温保存。采用 Lowry 法测定 IgY 总蛋白浓度; SDS-PAGE 电泳法测定 SF-IgY 纯度。SF-IgY 制品放置室温和 4℃ 保存, 每 3 个月用常规体外中和试

收稿日期: 2002-03-15 修回日期: 2003-05-07

基金项目: 杨凌职业技术学院科研基金(B52002002)。

作者简介: 张振仓(1971—), 男, 陕西省铜川市人, 助教, 在职硕士, 主要从事动物传染病方面研究和教学。

验检测一次效价。

1.4 SF-IgY 中和效价测定

参考文献[9], 利用 62 只齐卡兔常规体外中和试验。

1.5 安全试验

参考文献[9], 利用小白鼠和齐卡兔分别进行腹腔注射和皮下注射 SF-IgY 制品。

1.6 临床效力试验

随机选取具有临床症状(精神沉郁, 食欲废绝, 体温 40.5℃ 左右, 耳后、腹下、股内侧发绀)并经兔体交互试验确诊为猪瘟的 322 头病猪, 试验组 280 头用 SF-IgY 制品 200mL(含特异性 IgY

200mg)分两次隔日进行股内侧皮下分点注射, 对照组 42 头用市售一般多价抗血清常规剂量结合抗生素对症治疗, 对治疗结果进行 χ^2 检验。

2 结果与分析

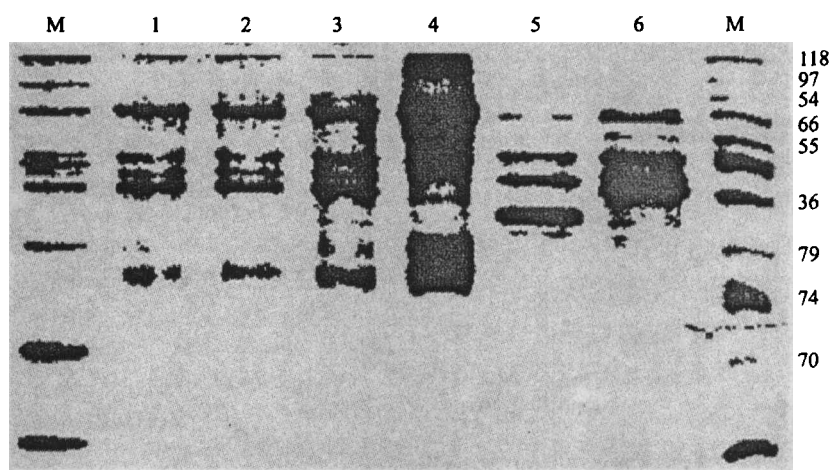
2.1 SF-IgY 总蛋白和纯度

表 1 说明, 制品中蛋白含量达 90.08g/L, 每枚蛋中蛋白含量为 225.2mg(每枚蛋以 15mL 卵黄液计)。同时, 免疫鸡血清及所制 SF-IgY 样品经电泳后都在 66—70KD 和 24—30KD 处出现了两个特异性条带(图 1)。

表 1 SF-IgY 制剂中总蛋白浓度和纯度

Table 1 Concentration and Purification of Total Protein in SF-IgY Preparation

批次 Group No.	制品蛋白含量/(g · L ⁻¹) Protein Concentration in Preparation	卵黄液蛋白含量/(g · L ⁻¹) Protein Concentration inEggyolk	制品中 IgY 纯度/% Purification of IgY in Preparation	制品中 IgY 含量/ (mg · mL ⁻¹) IgY Concentration in Preparation	卵黄液中 IgY 含量/ (g · L ⁻¹) Concentration of IgY in Eggyolk
1	90.08	15.01	44.49	40.07	6.68
2	89.37	14.89	49.02	43.80	7.30
3	90.78	15.13	42.91	38.96	6.50
平均 Average	90.08	15.01	45.14	40.93	6.83



M: 蛋白标记物; 1, 2, 3. 三个批次 SF-IgY 制品; 4. 免疫鸡血清; 5, 6. 未免疫鸡卵黄 IgY

M: protein marker; 1, 2, 3: preparations of three groups of SF-IgY; 4: Serum from Immunized Hens; 5, 6: IgY from unimmunized hens

图 1 SF-IgY12%SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 Results of SDS-PAGE Electrophoresis of SF-IgY

2.2 SF-IgY 制剂中和效价测定结果

表 2 说明进行中和试验的家兔和猪瘟兔化种

毒符合要求, 制品可以中和 1000MID 的猪瘟兔化种毒。

表 2 SF-IgY 制剂中和效价

Table 2 Neutralization Titer of SF-IgY Preparation

批次 Group No.	猪瘟兔化种毒各稀释度(MID) Dilution degree(in MID) of breeding SF virus hatched in rabbit							阴性对照 Negative Control	阳性对照 Positive Control
	20	40	100	200	500	1000	1250		
1	—, —	—, —	—, —	—, —	—, —	—, —	+, —	—, —	#, #
2	—, —	—, —	—, —	—, —	—, —	+, +	—, —	#, #	
3	—, —	—, —	—, —	—, —	—, —	+, +	—, —	#, #	

注: — 表示该家兔无热反应, + 表示该家兔出现热反应, # 表示该家兔出现定型热反应

Note: — means no fever in the rabbit; + means with fever in the rabbit; # means specific fever type in the rabbit

2.3 安全检验和有效期检查结果

将制品注射小白鼠、家兔,观察 10 d 后,所有注射动物均健活且无不良反应,捕杀后各内脏器官未见肉眼病理变化,说明该制品安全性良好,符合部颁《规程》要求。制品经常规体外中和试验检测,4℃保存 2 a 活性不变,室温保存 8 个月活性

不变,为 1000MID。

2.4 临床试验结果

用 SF-IgY 制品对 280 头确诊为猪瘟的病例进行治疗,治愈率为 88.2%,与一般市售多价抗血清制剂结合抗生素对症治疗相比差异极显著 ($P < 0.01$)。

表 3 SF-IgY 制品的临床应用效果
Table 3 Effects of SF-IgY Preparation in Clinic

组别 Group	病猪/头 No. of Pigs in ill	治愈 * 猪/头 No. of Cured * pigs	死亡猪/头 No. of Dead pigs	治愈率/% Cure rate
试验组 Text group	280	247	33	88.2 * *
对照组 Control group	42	16	26	38.1

注: *: 临床症状消失、食欲恢复、增重正常、猪群一个月无新病例出现 * *: 与对照组差异极显著 ($P < 0.01$)

Note: *: "Cure" means the syndromes of ill pigs disappeared, their appetite and weigh gaining recovered, and there are no new ill cases in a whole month. * *: significant different from control group (0.01)

3 讨论

3.1 蛋鸡免疫途径

研究表明通过后海穴注射可以发挥疫苗和穴位的双重作用,不仅可以提高机体的非特异性免疫功能,同时,又可增强疫苗的特异免疫作用^[10]。本实验用 SFV 经后海穴并结合其他免疫方法三次免疫鸡,在鸡卵黄中抗体的含量达到 1000MID,但小型鸡在免疫接种时易出现应激现象,这可能与免疫剂量过大有关。

3.2 SF-IgY 分离提取

用水稀释(WD)法或聚乙二醇(PEG)沉淀法均能有效提取 IgY,但 WD 法和 PEG 法分别存在稀释倍数太大不便操作和得率不高的缺点。本试验以 WD 法、PEG 法结合透析成功地制得抗猪瘟 IgY, IgY 平均获得率达到 6.83 g/L,比文献^[5, 7]报道 PEG 法的得率 4.9 g/L 高。表明利用 WD 法结合 PEG 法可以更有效地提取特异性 IgY。

3.3 SF-IgY 纯度

卵黄蛋白主要由低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、卵黄高磷蛋白、卵黄球蛋白构成,卵黄球蛋白又分为 α 、 β 、 γ 三种,其中 γ 球蛋白即为 IgY^[6]。本试验每枚鸡蛋中蛋白含量为 225.2mg,这与文献^[1, 6, 11]报道一致。

另外,样品还出现 3 条主要杂蛋白带,这与制品中 IgY 平均 45.14% 的纯度一致。与文献^[5, 7]报道 WD 法和 PEG 法的纯度 94% 和 89% 差异较大,这可能与透析难以除去杂蛋白有关。

3.4 SF-IgY 稳定性和临床应用效力

本试验所制 SF-IgY 制品在室温下存放 8 个

月或 4℃ 存放 2 a 免疫活性无明显变化。经检验表明安全性良好,而且可以中和 1000MID 的猪瘟纯化种毒,说明该提取物含有免疫活性较高的特异性抗体。临床对比治疗试验治愈率达 88.2%,与对照组差异极显著,是临床治疗猪瘟的理想生物制品。

参考文献:

- [1] 王 炯, 龚春梅, 赵树栋, 等. 鸡卵抗体(IgY)理化特性研究[J]. 中国生物制品学杂志, 1997, 10(3): 140~143.
- [2] 龙中儿, 钟青萍, 刘活林, 等. 卵黄免疫球蛋白的稳定性研究[J]. 中国生物制品学杂志, 1997, 10(4): 218~220.
- [3] 黄骏明. IgY 研究动态[J]. 预防医学进展, 1999, 1(1): 8~12.
- [4] 王德春. 蛋黄免疫球蛋白制备和应用研究进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 1995, 16(1): 22~24.
- [5] 耿立萍. 谷胱甘肽与免疫球蛋白的功能与制备[J]. 湖南食品与发酵, 1995, 1: 11~16.
- [6] 熊勇华, 钟青萍, 朱跃科, 等. 抗轮状病毒(anti-HRV)免疫蛋白的研究[J]. 中国畜产与食品, 1997, 4(2): 50~51.
- [7] Akita E M, Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with and enterotoxigenic E. Coli strain [J]. Jannal of Immunological Methods, 1993, 160: 207~214.
- [8] 梁 荣. 鸡的免疫球蛋白及其应用[J]. 国外兽医学—畜禽疾病, 1996, 17(2): 4~6.
- [9] 中华人民共和国农牧渔业部标准兽医生物制品制造及检验规程(第五版)[M] 1985.
- [10] 刁小平. 疫苗穴位免疫研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2002, 38(3): 38~39.
- [11] 杨婷婷. 鸡卵黄抗体的提纯及其在医学上的应用[J]. 医学进展, 2000, 16(3): 25~29.