

抑制素基因免疫对黄牛孪生的影响

崔先利¹ 杨利国² 茆达干¹ 王水莲³ 李复兴⁴

(1. 南京农业大学 动物繁育所, 南京 210095; 2. 华中农业大学 动物科技学院, 武汉 430070;
3. 湖南农业大学 动物科技学院, 长沙 410128; 4. 河南省唐河县 黄牛育种站, 河南 南阳 473400)

摘要 为增强肉牛的繁殖力,应用本实验室构建的抑制素真核融合表达质粒 pCISI,提纯后辅以不同的免疫佐剂注入 96 头母黄牛体内,采用 AMI-900 兽用 B 超对其中 84 头发情牛进行卵泡检测,并对其中 78 头妊娠牛进行早期胚胎数目检测。结果发现:抑制素质粒 pCISI 能促进双大卵泡发育(80.95%,68/84),诱发排双卵(60.71%,51/84),诱导黄牛孪生(41.03%,32/78);普鲁卡因佐剂(48.78%)比脂质体(32.43%)效果明显。研究表明,抑制素基因免疫能有效提高黄牛的繁殖率。

关键词 抑制素 pCISI; 基因免疫; 黄牛; 排卵; 双胎

中图分类号 S 814.8

文章编号 1007-4333(2006)03-0027-04

文献标识码 A

Influence of inhibin gene immunization on twinning in cattle

Cui Xianli¹, Yang Ligu², Mao Dagan¹, Wang Shuilian³, Li Fuxing⁴

(1. Institute of Animal Reproduction, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095;
2. Academy of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070;
3. Academy of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;
4. Cattle Breeding Station, Tanghe County, Hennan Province, Nanyang 473400, China)

Abstract To improve the fertility of cattle, the fusion expressing plasmid of inhibin pCISI, which was designed and extracted in our laboratory, was used to immune the 96 female cattle. Besides, the AMI-900 ultrascanner was adopted to examine the follicles of 84 ruttish cattles and the embryos of 78 pregnant cattles. The results showed that inhibin pCISI could cause two big follicles development (80.95%,68/84) and induce two mature follicles bringing out (60.71%,51/84). Meanwhile, inhibin pCISI could induce 41.03% (32/78) cattle twinning. The procaine had obviously a better effect than the liposome (48.78% vs. 32.43%). The research proved that inhibin gene immunization could effectively improve the reproduction rate of cattles.

Key words inhibin pCISI; gene immunity; cattle; ovulate; twinning

提高单胎动物繁殖性能,特别是对产仔间隔较长的牛来说,人工诱导孪生以提高繁殖率,直接影响到牛数量的增加及生产力水平。该研究也取得了较大的成果,涉及遗传选择、激素诱导、胚胎移植、转基因动物等诸多领域^[1]。1992 年以来,南京农业大学动物繁育所开展了小鼠、大鼠、绵羊等动物的抑制素免疫研究^[2]。抑制素是一种主要由睾丸支持细胞和卵巢颗粒细胞等组织分泌的蛋白激素,对促卵泡素(FSH)分泌具有反馈性抑制作用。抑制素基因免

疫是将编码抑制素抗原蛋白的外源基因以重组表达载体的形式转化入动物体内,使目的基因通过宿主细胞的转录系统合成抗原蛋白,诱导宿主免疫系统产生抗体以中和体内抑制素,导致体内 FSH 含量的升高,繁殖率提高^[3]。该技术以其疫苗稳定、高效安全、操作简便、成本低、便于大规模生产等优势弥补了以往诱导双胎技术的不足。南京农业大学动物繁育所现已构建了多种抑制素基因免疫用重组质粒,免疫结果表明:抑制素基因免疫质粒能够在动物

收稿日期:2005-11-07

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270959);南京农业大学校级青年创新基金资助(y200411)

作者简介:崔先利,硕士研究生;杨利国,教授,博士生导师,主要从事家畜繁殖学研究,E-mail:ylg@mail.heau.edu.cn

体内表达,表达产物具有抑制素免疫原性^[4-6]。本研究通过配以不同佐剂的抑制素质粒免疫黄牛,旨在了解抑制素 DNA 免疫对黄牛生殖方面的影响,优化抑制素基因免疫技术。

1 材料与方 法

1.1 试验动物与分组

选自河南省南阳市唐河县农户散养的南阳黄牛。处理组:96头,均为健康、体重接近、经产、产后3个月内的空怀母牛;随机均分2组,一组为普鲁卡因佐剂处理组,另一组为脂质体佐剂处理组。对照组:80头,均为健康的发情母牛。

1.2 试验试剂

抑制素 pCISI 质粒 DNA:双拷贝抑制素真核融合表达质粒 pCISI 由南京农业大学动物繁育所构建,大连宝生公司鉴定^[5]。选含有 pCISI 质粒的大肠杆菌单菌落于含 Amp 的 LB 培养基中扩增培养,碱裂解法大量抽提 pCISI 质粒 DNA,并用 LiCl 法加以纯化^[7]。酶切、电泳、分光光度计检测,直至质粒 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 为 1.8~2.0。最后用生理盐水对质粒 DNA 进行浓缩,将终质量浓度调至 1 mg/mL。

pCISI 基因脂质体:脂质体购于南京动物激素厂,按 1:1(质量比)包裹抑制素 pCISI 质粒 DNA。

0.5%(体积分数,下同)盐酸普鲁卡因,市售。

1.3 试验仪器

离心机,恒温振荡器,电泳仪,电泳槽,紫外分光光度仪,系列加样器,注射器,AMF-900 兽用 B 超机,5.0 MHz 直肠线阵探头,人工授精系列器具。

1.4 试验方法

1) 免疫程序。初次免疫 21 d 后进行加强免疫,免疫部位为左右臀部肌肉。程序为:普鲁卡因佐剂处理组母牛在初次免疫时,于两侧肌肉各注射 0.5% 普鲁卡因 1 mL,然后于相同部位各注射 pCISI 质粒 1 mL(共含 pCISI 2.0 mg);加强免疫时,普鲁卡因和 pCISI 注射量各减半。脂质体佐剂处理组母牛初次免疫时于两侧臀肌各注射 pCISI 基因脂质体 1 mL(共含 pCISI 2.0 mg),加强免疫时用量减半。

2) 卵泡发育及排卵情况检测。从牛发情当天开始到排卵结束,至少进行 3 次 B 超探查,主要检测卵巢大小、成熟卵泡和黄体的数目。

3) 早期妊娠诊断。直肠检查法与 B 超诊断法相结合,对配种后 30~60 d 的母牛至少进行 2 次探

查,主要检测子宫对称与否、妊娠黄体数目、胎儿数目和大小。

4) 数据分析。采用 SPSS10.0 进行统计学分析,对卵泡数、排双卵牛数、双胎牛数的组间差异采用方差分析法,对排双卵率、双胎率采用卡方检验。

2 试验结果

2.1 抑制素质粒 pCISI 免疫对黄牛卵泡发育和排卵的影响

处理组卵巢略大于对照组,但差异不显著($P > 0.05$),普鲁卡因佐剂处理组和脂质体佐剂处理组之间差异也不显著($P > 0.05$)。处理组成熟卵泡的平均发育个数为 1.94(163/84),比对照组平均多 0.54 个,统计结果差异显著($P < 0.05$)。处理组诱发 60.71%(51/84) 牛排双卵,也显著高于对照组 13.75%($P < 0.05$)。不同佐剂的抑制素 pCISI 免疫,普鲁卡因佐剂处理组的 71.11%(32/45) 母牛排双卵,较脂质体佐剂处理组(48.7%,19/39) 效果明显($P < 0.05$)。

2.2 抑制素质粒 pCISI 免疫对黄牛胚胎发育和数目的影响

抑制素质粒 pCISI 能诱导 41.03%(32/78) 黄牛怀双胎,比对照组多 37.03%,差异极显著($P < 0.01$)。普鲁卡因佐剂(48.78%,20/41) 比脂质体佐剂(32.43%,12/37) 效果明显($P < 0.05$) (表 1)。

3 讨 论

3.1 双拷贝抑制素 pCISI 基因免疫对黄牛生殖活动的影响

1) pCISI 免疫对黄牛发情周期的影响。

本研究期间,通过询问上次分娩和发情时间检查黄牛的发情周期,连续 4 个月,发现绝大多数母牛发情周期正常,为 21 d 左右。Glencross 等曾用抑制素免疫青春期前小母牛,发现母牛到达初情期的年龄和体重不受影响,发情周期与对照组相比差异不显著,分别为(19.9 ± 0.5)和(19.8 ± 0.5) d^[8]。因此可以认为抑制素 pCISI 基因免疫对发情周期没有影响。

2) pCISI 基因免疫对黄牛卵巢、卵泡发育、排卵的影响。

用抑制素质粒 pCISI 加强免疫后,对黄牛卵巢大小影响不大,仅仅因为成熟卵泡数目增多而有所增大,因此免疫具有一定的安全性,不会造成卵巢囊

肿等病症。

抑制素基因免疫动物后,所产生的抑制素抗体中和了外周血浆中的抑制素,削弱对 FSH 的抑制作用,使 FSH 分泌增加,从而促进卵泡的发育。在优势卵泡局部调节因子的协同作用下,FSH 受体增多,对 FSH 的敏感性增强,保证了优势卵泡的发育。

本实验中,处理组成熟卵泡的发育个数为 1.94,具有双大卵泡牛的数量占总量的 80.95%,排双卵的牛数量占总量的 71.11%,与对照组相比,统计结果差异显著($P < 0.05$)。可见,抑制素融合质粒 pCISI 免疫黄牛,可促进卵泡发育,提高大卵泡数目,增加排卵率和黄体数。

表 1 抑制素 pCISI 免疫对黄牛卵泡和胚胎的影响

Table 1 Effect of immunization against inhibin pCISI on follicular and embryo in cattle

项 目	普鲁卡因佐剂处理组	脂质体佐剂处理组	处理组合计	对照组
总牛数/头	48	48	96	
发情并配种牛/头	45	39	84	80
发情率(配种率)/%	93.75	81.25	87.50	
总成熟卵泡数	87	76	163	112
均头牛成熟卵泡数	1.93*	1.95*	1.94*	1.40
至少双成熟卵泡的牛/头	36	32	68	28
排双卵的牛/头	32*	19	51*	11
排双卵率/ %	71.11**	48.72*	60.71*	13.75
妊娠牛/头	41	37	78	75
具有双胞胎的牛数/头	20*	12*	32**	3
双胎率/ %	48.78**	32.43*	41.03**	4.00

注:同一行中,无*者与对照组相比为差异不显著 $P > 0.05$, *为差异显著 $P < 0.05$, **为差异极显著 $P < 0.01$ 。

3) pCISI 基因免疫对黄牛胚胎的影响。

抑制素免疫可提高母畜的产仔数,张小冬等用抑制素免疫 3 岁的考力代母羊,结果处理组的羊全部受胎并产羔,各组妊娠期无明显差异^[9]。抑制素免疫可提高黄牛的孪生率。杨利国等用猪精液抑制素主动免疫黄牛,妊娠期末,57 头母牛中有 15 头牛产出双胎,孪生率达 26.3%^[10]。本实验通过 B 超的早期妊娠检查,发现处理组的双胎率达 41.03%,显著高于对照组。另外,处理组中双胎的胚体、孕囊大小,与单胎的大小相比,差异不显著,与妊娠时间一致。由此可见,pCISI 基因免疫可以诱导黄牛怀双胎,对胎儿发育没有显著影响。

3.2 免疫佐剂对抑制素 pCISI 基因免疫效果的影响

影响抑制素基因免疫效果的因素主要有免疫原、免疫方法、免疫佐剂、免疫剂量、免疫次数、免疫间隔等。

南京农业大学动物繁育所将抑制素基因插入到乙肝表面抗原基因 S 区的第 112 与 113 氨基酸密码

之间,形成具有更好免疫原性的双拷贝抑制素表位^[11]。由于肌细胞能将 DNA 疫苗的作用效率提高 10 倍以上,因此本实验选用二次肌肉免疫;是否随着免疫次数的增加免疫反应就能增强,需要进一步探索。

免疫佐剂本身不具有免疫原性,而与抗原合用或前后使用时能增强抗原免疫原性或改变免疫反应类型的物质。抑制素常规免疫通常用弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂,抑制素基因免疫的佐剂主要有化学因子、免疫刺激序列或细胞因子等。本实验主要比较了普鲁卡因和脂质体 2 种佐剂的免疫效果。

脂质体作为一种可供选择的质粒传递载体,具有无毒、无免疫原性,可生物降解,可保护质粒 DNA 免被核酸酶降解的特点,介导 DNA 免疫可提高体液免疫和细胞免疫反应^[12]。普鲁卡因可以提高浸润的肌肉对疫苗的吸收能力,从而增强 T 细胞增殖反应和 CLT 反应。本研究中,普鲁卡因佐剂处理组的排卵率、双胎率都显著高于脂质体佐剂处理组,证明了在抑制素 pCISI 基因免疫中,以 0.5% 普鲁卡

因为免疫佐剂比脂质体佐剂免疫效果更为显著。

用抑制素基因免疫,可以长时间地降低体内抑制素水平,可提前动物的发情,提高动物的排卵率和精子的产量,从而提高动物的繁殖力,服务于科研和生产。随着分子生物学的进一步发展,目的基因的获得日趋容易,分离纯化抑制素基因逐步简易,该疫苗必将大规模应用于畜牧业生产。

参 考 文 献

- [1] 杨利国. 母牛人工孪生研究进展[J]. 草与畜杂志, 1987, (4): 37-38
- [2] 牛树理, 叶荣, 杨利国. 猪精液抑制素主动免疫黄牛诱导超数排卵的研究[J]. 南京农业大学学报, 1996, 19(4): 52-55
- [3] Donnelly J J, Feltquate D M, Heaneys R G. DNA vaccines [J]. Annu Rev Immunology, 1997, 15: 617-648
- [4] 姜勋平, 杨利国, 刘桂琼, 等. 抑制素基因免疫对小鼠生殖的影响[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(4): 368-370
- [5] 茆达干, 杨利国, 曹少先, 等. 卵泡抑制素和乙肝表面抗原融合基因表达质粒的构建及表达[J]. 中国免疫学杂志, 2003, (11): 775-778
- [6] 张德坤, 杨利国, 张红琳, 等. 抑制素基因免疫诱导单胎绵羊孪生的研究[J]. 中国农业大学学报, 2004, 9(4): 40-45
- [7] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 金冬雁, 译. 北京: 科学出版社, 1998
- [8] 苗明三, 主编. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京: 中国中医出版社, 1997
- [9] 张小冬, 程瑞禾, 夏银. 人抑制素合成肽与猪精液抑制素提取物主动免疫对母羊生殖激素、妊娠及产羔的影响[J]. 南京农业大学学报, 1998, 21(4): 66-71
- [10] 杨利国, 桑润滋, 张居农. 肉牛生产与产品加工[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 61-65
- [11] 曹少先, 杨利国, 茆达干. 生长抑素 DNA 疫苗 pcS/SS 质粒的构建及其在 HeLa 细胞中的表达[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(2): 153-156
- [12] 袁慧君, 王三虎. 基因免疫研究进展[J]. 河南职业技术学院学报, 2004, 32(3): 42-44