

利用小鼠模型的脲酶免疫刺激物效果评价

章玉涛^{1,2} 王加启^{1*} 赵圣国¹ 胡小丽¹ 卜登攀¹ 周凌云¹

(1. 中国农业科学院 北京畜牧兽医研究所/动物营养学国家重点实验室,北京 100193;

2. 甘肃农业大学 动物科技学院,兰州 730070)

摘要 建立小鼠模型对制备的脲酶免疫刺激物进行免疫效果及其安全性评价。利用 IPTG 诱导脲酶基因克隆菌,大量表达脲酶 UreB 蛋白,用 SDS-PAGE 及 Bradford 方法对表达产物进行定性和定量分析;将脲酶 UreB 蛋白与弗氏(不)完全佐剂混合并乳化,制备成脲酶免疫刺激物。选择健康昆明小白鼠 40 只,随机分为 4 组,分别注射脲酶免疫刺激物、弗氏(不)完全佐剂和生理盐水,同时设置非注射为空白对照。利用间接 ELISA 测定特异性抗体效价,利用血常规分析仪和流式细胞仪测定小鼠血常规。结果表明:构建克隆菌株可以大量表达脲酶 B 蛋白,质量浓度为 0.39 mg/mL。小鼠血清中特异性 IgG 抗体效价能达到 1:10 000 以上,显著高于其他 3 个对照组($P < 0.05$),而特异性抗体 IgA 和 IgM 效价与对照组比较差异不显著($P > 0.05$)。脲酶免疫刺激物能显著提高小鼠血中白细胞、淋巴细胞和中间细胞数及比例($P < 0.05$),而对血液其他指标没有显著影响($P > 0.05$)。本试验成功制备脲酶免疫刺激物,并能有效刺激机体免疫应答,为后期奶牛免疫试验打下基础。

关键词 小鼠;脲酶;免疫刺激物;抗体效价

中图分类号 Q 556.4

文章编号 1007-4333(2011)03-0107-05

文献标志码 A

Evaluateion of the effect of urease immunostimulants by using a murine model

ZHANG Yu-tao^{1,2}, WANG Jia-qi^{1*}, ZHAO Sheng-guo¹, HU xiao-li¹,
BU Deng-pan¹, ZHOU ling-yun¹

(1. State Key Laboratory of Animal Nutrition/Institute of Animal Science,

Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2. College of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract The object of this study is to prepare and evaluate the urease immunostimulants. The protein concentration was identified and quantified identified by SDS-PAGE and Bradford respectively after UreB was expressed. To prepare urease immunostimulants,UreB protein and Freund's complete (incomplete) adjuvant were mixed and emulsified. Forty healthy mice were randomly allocated to four groups, where three groups were immunized with urease immunostimulants,Freunds complete (incomplete) adjuvant and physiological saline. and the fourth group served as the non-immunization control. The mice were immunized once every two weeks for three times. One week after the third immunization,bloods were sampled. Specific antibody titers were determined by the method of ELISA, and the mice blood was determined by blood analyzer and flow cytometry. Urease B protein was expressed and purified successfully with the concentration of 0.39 mg/mL. Serum specificity IgG titer of mice can reach above 1:10000, which was significantly higher ($P < 0.05$) than other 3 control groups, but specific IgA and IgM titers were not a significant difference between other 3 control groups ($P > 0.05$). The number of white blood cells, lymphocyte and intermediate cell were improved by urease immunostimulants ($P < 0.05$), and other blood index had no significant influence ($P >$

收稿日期: 2010-10-25

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(6092017)

第一作者: 章玉涛, 硕士研究生, E-mail: zhangyutao132@163.com

通讯作者: 王加启, 研究员, 主要从事反刍动物营养和牛奶质量改良研究, E-mail: wang-jia-qi@263.net

0.05). Urease immunostimulants was prepared, and it could lead to the immune response, this built a foundation for further experiment regarding cows immunization.

Key words mice; urease; immunostimulants; antibody titer

反刍动物瘤胃中脲酶可以特异性催化尿素生成氨,为微生物合成菌体蛋白提供底物,因此尿素可以在反刍动物氮代谢中替代日粮中粗蛋白的9%~12%^[1],在反刍动物的营养上有着重要意义。但瘤胃内脲酶分解尿素生成氨的速度是微生物利用氨的4倍,使大量的氮素未得到有效的利用而被浪费^[2],因此降低脲酶活性,减缓尿素分解速度,可以有效的提高微生物对氨的利用率,防止氨中毒。目前认为比较有效的脲酶抑制剂有:1) 氧肟酸类化合物(hydroxamate acids),如乙酰氧肟酸(AHA)、辛酰氧肟酸(CHA)等;2) 金属离子,如 Mn^{2+} 和 Ba^{2+} 等;3) 其他,如氢醌、苯磷酰化合物,四硼酸钠等^[3]。但由于大部分抑制剂易被氧化而失活,且同时兼有高效、低廉、无毒、无污染的抑制剂很少,这就造成了脲酶抑制剂在生产上应用的局限性。寻求其他途径对瘤胃内脲酶进行抑制已成为现今研究的热点。目前国内外通过免疫刺激对瘤胃内菌群调控做了大量研究^[4-7],包括对产甲烷菌、乳酸生成菌以及脲酶生成菌等抑制的研究,其中利用植物脲酶(刀豆脲酶)作为抗原,免疫奶牛后未能有效抑制瘤胃细菌脲酶活性,也未减缓尿素分解速度^[4],这是由于瘤胃细菌脲酶与植物脲酶之间的免疫原性相差太大所导致,而细菌间的免疫原性会更加接近。本试验选择细菌脲酶作为抗原,制备免疫刺激物后利用昆明小白鼠模型对疫苗效果和安全性进行评价,旨在为研究细菌脲酶抗原对奶牛瘤胃脲酶活性调控提供指导。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂及仪器

LB培养基,异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG,美国Sigma公司),弗氏完全佐剂及弗氏不完全佐剂(美国Sigma公司),四甲基联苯胺(美国Kehaoze公司),酶标仪(Infinite F200,瑞士Tecan公司),超声破碎仪(Scientz-II D,美国Scientz公司),乳化器(美国Homogenizer Workcenter公司)、蛋白测定试剂盒(美国Beyotime公司),ELISA间接测定试剂盒(Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX,美国),96孔酶标板(美国Costar公司)。

1.2 方 法

1.2.1 脲酶 B 的表达

从本实验室前期构建的奶牛瘤胃微生物BAC文库中选取筛选获得的脲酶基因克隆菌^[8],37℃过夜活化,接种到500 mL的LB培养基中扩大培养。当 $OD=0.6\sim 0.8$ 时,加入250 μ L浓度为1 mmol/L的IPTG,诱导3 h后6 000 r/min离心15 min回收菌体。进过反复冻融,加入100 μ L的溶菌酶及5 μ L的核酸酶,孵育37℃,30 min。经超声破菌后(功率300 W,超声5 s,停5 s,20 min),收集细胞内液,12 000 r/min离心10 min。利用Buffer B(Triton 5%(体积分数),Tris-HCl 50 mmol/L,NaCl 50 mmol/L,EDTA 5 mmol/L)重悬后静置3 h,同样12 000 r/min离心10 min,收集上清液为洗涤后包涵体。利用2 mol/L尿素Tris-HCl(pH8.0)洗涤2次,利用8 mol/L尿素Tris-HCl(pH8.0)溶解蛋白,收集纯化后脲酶B蛋白溶解液进行测定。每步洗涤中间利用10 mmol/L的Tris-HCl洗涤2次,每次静置10 min。后利用SDS-PAGE凝胶电泳检测其纯化效果,同时利用Bradford方法检测蛋白质浓度。

1.2.2 脲酶免疫刺激物的制作

将脲酶蛋白溶解液与弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂等体积的混合,利用乳化器进行乳化,制成弗氏完全佐剂疫苗和弗氏不完全佐剂疫苗。

1.2.3 免疫小鼠

选择健康昆明小白鼠(体重16~18 g,雌性)40只随机分为4组,每组10只,分别为疫苗处理组、佐剂对照组、生理盐水处理组以及空白对照组,进行背部皮下多点注射,处理组注射抗原蛋白量为200 μ g/只,注射体积为0.5 mL;生理盐水对照组注射相同体积的生理盐水;佐剂对照组利用生理盐水代替蛋白溶解液,等体积混合并乳化,同样注射相同体积;空白对照组不注射。初次免疫使用弗氏完全佐剂疫苗,后期免疫则利用弗氏不完全佐剂疫苗,每隔2周免疫1次,共免疫3次,在第3次免疫后1周进行眼球采血^[9-10]。

1.2.4 小鼠抗体效价测定

小鼠特异性抗体效价利用间接ELISA进行测

定。利用 PBS(KHPO₄ 14.03 mmol/L, Na₂HPO₄ · 12H₂O 43.00 mmol/L, NaCl 1.3 mol/L, KCl 26.83 mmol/L, pH7.4) 将纯化后的脲酶蛋白进行稀释, 终质量浓度为 40 μg/mL, 在酶标板上每孔 100 μL, 4 °C 过夜包被。利用 1% (体积分数) 的牛血清白蛋白每孔 150 μL, 37 °C, 封闭 90 min。测定 IgA 及 IgM 时将样本从 1 : 200 开始稀释到 1 : 12 800, IgG 测定样本则从 1 : 10 开始稀释至 1 : 1 000 000; 每孔加样 100 μL, 同时利用胎牛血清作为阴性对照, PBS 为空白对照, 孵育 90 min; 按试剂盒说明将酶标二抗进行稀释, 每孔加入 100 μL, 37 °C, 孵育 90 min。加入 TMB 反应 20 min, 用 2 mol/L 的 H₂SO₄ 终止反应, 每孔 50 μL, 在吸光值为 450 nm 下进行读数。抗体效价判定: PN = (样品孔 OD 值 - 空白孔 OD 值) / (阴性对照孔 OD 值 - 空白孔 OD 值) ≥ 2 为阳性, PN ≥ 2 的最小稀释倍数作为该血清的特异性抗体效价 (U), 利用 lg(U+1) 转化其抗体效价进行统计分析^[7]。

1.2.5 小鼠血常规测定

血液样本送北京西苑医院检测, 利用血常规分析仪 (MEK-6318K 型, 日本) 和流式细胞仪 (EPICS ELITE 型, 美国) 对小鼠血常规及血细胞进行测定, 将其数量级利用 lg 转换后进行统计分析。

1.3 数据处理及分析

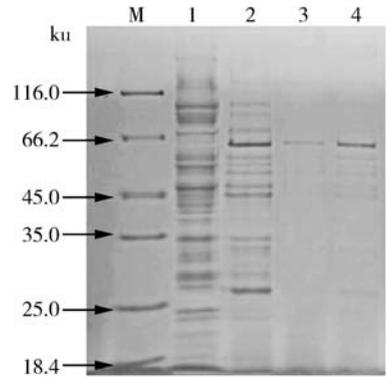
试验数据通过 Excel 输入, 利用 SAS8.2 的 GLM 程序进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 脲酶 B 的表达及回收

脲酶基因克隆菌经 IPTG 诱导后, 脲酶大量表

达, 经 SDS-PAGE 电泳检测, 表明脲酶 UreB 蛋白主要以包涵体的形式进行表达, 利用 8 mol/L 尿素 Tris-HCl 溶解后, 在 64 ku 处有较为明显的条带 (图 1), 可判定为脲酶 B, 经 Bardford 法测定脲酶蛋白质量浓度为 0.39 mg/mL。



M. 蛋白 marker; 1. 细菌胞内液; 2. 包涵体; 3. 未溶解脲酶 UreB 蛋白上清液; 4. 溶解后的脲酶 UreB 蛋白。

图 1 表达后 UreB 的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 SDS-PAGE profile of UreB expressed product

2.2 脲酶免疫刺激物对小鼠血清特异性抗体效价影响

利用 ELISA 方法对小鼠血清中特异性抗体效价进行测定, 结果见表 1。免疫刺激复合物处理组特异性抗体 IgG 的效价显著高于其他 3 个处理组 (P < 0.05), 免疫刺激复合处理组 IgM 效价高于其余 3 组, 但未达到显著水平 (P > 0.05)。同样脲酶免疫刺激复合物处理组 IgA 效价组高于其余 3 组, 与佐剂处理组差异显著 (P < 0.05), 与空白组和生理盐水组差异不显著 (P > 0.05)。

表 1 脲酶免疫刺激物对小鼠血清中特异性抗体效价的影响

Table 1 Effect of urease immunostimulants on specific antibody titers in mice serum

指标*	处理				SEM	P
	空白	生理盐水	佐剂	脲酶免疫刺激物		
IgA	2.85 ± 0.12 a	2.80 ± 0.24 a	2.75 ± 0.16 b	3.10 ± 0.24 a	0.08	0.031
IgM	3.40 ± 0.15	3.51 ± 0.32	3.30 ± 0.15	3.61 ± 0.15	0.08	0.117
IgG	3.00 ± 0.63 b	3.17 ± 0.40 b	3.50 ± 0.54 b	4.83 ± 0.40 a	0.21	<0.01

注: 同行数值后字母相同表示差异不显著 (P > 0.05), 字母不同表示差异显著 (P < 0.05)。* 以 lg(U+1) 形式将抗体效价数据进行转换。

2.3 脲酶免疫刺激物对小鼠血常规的影响

通过测定 18 项血液指标 (表 2), 显示免疫刺激

复合物处理组的白细胞数和淋巴细胞数显著 (P < 0.05) 高于其他 3 组对照, 佐剂组显著 (P < 0.05) 高

于生理盐水和空白对照组,生理盐水对照组和空白对照组之间差异不显著($P>0.05$)。而免疫刺激复合物处理组的中间细胞数和中间细胞数百分比显著

($P<0.05$)高于其他3组对照,佐剂组、生理盐水组和空白对照组之间则没有显著差异($P>0.05$)。

表2 脲酶免疫刺激物对小鼠血常规的影响

Table 2 Effect of urease immunostimulants injections on mice blood

指标	处理				SEM	P
	空白	生理盐水	佐剂	脲酶免疫刺激物		
白细胞数*/(lg/L)	9.76±1.18 c	9.82±1.44 abc	9.91±1.45 ab	9.93±1.55 a	0.10	0.011
红细胞数*/(lg/L)	12.66±3.40	12.96±0.52	12.92±0.98	12.92±1.22	0.43	0.607
血红蛋白*/(lg/L)	135.60±10.27	136.50±8.98	132.20±15.59	126.00±14.49	11.9	0.553
红细胞体积/fL	52.51±2.62	52.65±1.83	53.64±3.52	54.25±3.32	2.68	0.727
红细胞血红蛋白/pg	14.96±0.50	15.07±0.60	15.66±0.36	15.00±0.76	0.59	0.185
红细胞血红蛋白/(g/L)	285.60±11.73	286.80±15.51	292.80±15.73	277.00±4.83	13.2	0.379
血小板计数*/(lg/L)	11.72±0.07	11.62±0.15	11.64±0.11	11.83±0.17	0.15	0.144
血小板体积/fL	7.63±0.35	7.43±0.61	7.38±0.51	7.98±0.45	0.50	0.291
淋巴细胞数*/(lg/L)	9.68±0.06 c	9.75±0.11 abc	9.83±0.05 ab	9.85±0.07 a	0.11	0.024
中间细胞数*/(lg/L)	8.57±0.12 b	8.63±0.08 b	8.76±0.31 b	9.11±0.18 a	0.26	0.001
中性粒细胞*/(lg/L)	8.70±0.34	8.71±0.16	8.64±0.47	9.15±0.67	0.32	0.153

注:同行数值后字母相同表示差异不显著($P>0.05$),字母不同表示差异显著($P<0.05$)。*为每升血清中细胞数目的对数值。

3 讨论

1)毛旭虎等^[11]利用UreB口服免疫BalB/c小鼠后,与对照组相比,血清、唾液(粪便)及胃粘膜均产生了针对幽门螺杆菌抗原特异的IgG和IgA反应($P<0.05$);高志刚等^[12]利用其他不同的免疫途径,同样得到了相似的结果,他以不同剂量UreB或加不同佐剂的疫苗滴鼻免疫BALB/c小鼠后,各试验组中血清特异性IgG及各黏膜冲洗液中特异性IgA的水平均明显增高。本试验基于已构建好的脲酶B基因克隆,进行大量诱导表达,并通过多步洗涤的方法回收脲酶B蛋白,通过SDS-PAGE凝胶电泳检测,发现在8 mol/L的尿素Tris-HCl洗涤时有大量的脲酶B蛋白溶解,同时除去了大部分的杂蛋白,达到了制备亚单位疫苗的标准。

2)通过胃肠道免疫途径抑制菌株通常采用口服疫苗的方式,但对反刍动物来说,口服疫苗除蛋白酶和胃酸对疫苗的影响外,同时存在瘤胃内微生物对其降解,使疫苗易被破坏等问题,因此有研究开始利用其他途径进行免疫,以达到提高反刍动物体内抗脲酶抗体滴度的目的。例如,高东旗等^[13]利用幽门

螺杆菌全菌疫苗对奶牛进行皮下免疫,血清中特异性抗体IgG有着显著的提高,效价可达1:51 200以上;张天哲等^[14]利用幽门螺杆菌全菌疫苗在羊身上对多种免疫途径进行了比较,其中包括滴鼻免疫、皮下免疫和肌肉免疫3种途径,发现3种途径都能激发奶羊机体的免疫应答,使羊奶中抗Hp-IgA和抗Hp-IgG的抗体水平升高,血清中IgG抗体水平升高。但使用全菌疫苗的同时,还存在一定风险,如抗原成分复杂,存在免疫效果较差、不良反应较大、易通过交叉免疫反应导致自身免疫性疾病等一系列不良反应。因此,全细胞疫苗缺乏安全性,目前已经逐步被亚单位疫苗所取代^[15]。本试验中利用亚单位脲酶B为抗原蛋白,采用多点背部皮下免疫,以避免消化道对疫苗效果的影响,判定脲酶B疫苗对模型动物血清中特异性抗体及健康的影响。结果表明:血液中的IgG特异性抗体效价在1:10 000以上,显著高于对照组($P<0.05$);特异性的IgA及IgM特异性抗体效价高于对照组,但未到达显著水平($P>0.05$),试验表明通过脲酶B免疫刺激物能较好的引起小鼠血清中特异性IgG含量的升高,而对于促进血管内免疫的IgM及外分泌粘膜免疫的

IgA 影响较小。通过皮下免疫脲酶 B 疫苗途径可以有效的引起动物机体内总特异性抗体水平的提高,尤其是对参与血液、组织液及淋巴液免疫 IgG 的提高。对小鼠血常规及血细胞的测定表明,除免疫细胞数(白细胞数、淋巴细胞数和中间细胞数)有显著上升外($P < 0.05$),其余血液常规指标并没有达到显著水平,说明脲酶 B 亚单位有良好的免疫原性和反应原性,可较好的刺激小鼠体内的免疫应答,且对其他血液指标没有显著影响,可作为制作疫苗的抗原蛋白。本研究表明脲酶免疫刺激复合物能有效的刺激机体产生免疫应答,为今后利用脲酶 B 免疫反刍动物调控瘤胃内尿素分解速度的研究奠定一定的基础,但具体对瘤胃内脲酶活性的具体影响仍需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 刘振伟,刘文忠,丁衍涛,等. 尿素在奶牛生产中的合理应用[J]. 中国饲料添加剂,2006,12(54):37-39
- [2] Bloomfield. Kinetics of urea metabolism in sheep[J]. J Anim Sci,1960,19:1248-1254
- [3] 于炎湖,詹志春,胡昌彬,等. 脲酶抑制剂在反刍动物饲养中的应用[J]. 饲料工业,2003,24(7):4-5
- [4] Marini J C, Simpson K W, Gerold A, et al. The effect of immunization with jackbean urease on antibody response and nitrogen recycling in mature sheep[J]. Livest Prod Sci,2003,81:283-292
- [5] Wright A D, Kennedy P, O'Neill C J, et al. Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens[J]. Vaccine,2004,22:3976-3985
- [6] Williams Y J, Popovski S, Rea S M, et al. A vaccine against rumen methanogens can alter the composition of archaeal populations[J]. Appl Environ Microbiol,2009,75:1860-1866
- [7] Shu Q, Bir S H, Gill H S, et al. Antibody response in sheep following immunization with streptococcus bovis in different adjuvants[J]. Vet Res Commun,2001(1):43-54
- [8] 赵圣国,王加启,卜登攀,等. 奶牛瘤胃微生物 BAC 文库中脲酶克隆的筛选与分析[J]. 中国农业大学学报,2008,13(6):61-65
- [9] Kleanthous H, Myers G A, Georgakopoulos K M, et al. Rectal and intranasal immunizations with recombinant urease induce distinct local and serum immune responses in mice and protect against *Helicobacter pylori* infection[J]. Infect Immun,1998,66(6):2879-2886
- [10] 李妍,宁云山,洪燕华,等. 抗幽门螺杆菌单克隆抗体的制备与鉴定[J]. 南方医科大学学报,2006,26(4):425-427
- [11] 毛旭虎,邹全明,鲁东水,等. BalB/c 小鼠口服重组幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位的免疫应答[J]. 第三军医大学学报,2002,24(3):280-282
- [12] 高志刚,邹全明,郭刚,等. 重组幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位疫苗鼻腔免疫的实验研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2003,19(1):68-70
- [13] 高东旗,李仕英,王庭桂. 含抗幽门螺杆菌特异性抗体免疫牛奶的制备[J]. 医学动物防制,2005,21(1):1-2
- [14] 张天哲,袁聚祥,徐应军,等. 幽门螺杆菌免疫奶羊的免疫应答机制及其应用前景分析[J]. 卫生研究,2005,34:82-84
- [15] Del Giudice G, Covacci A, Telford J L, et al. The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development [J]. Annu Rev Immun,2001,19:523-563

(责任编辑: 苏燕)