

SPF 雏鸡感染禽脑脊髓炎病毒内蒙株早期 IgM 与 IgG 变化规律的研究*

昭日格图¹, 马学恩²

(1. 内蒙古大学高分子化学及蒙药研究所, 呼和浩特 010021; 2. 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018)

摘要: 本研究采用了病毒接种技术、普通病理学方法、酶联免疫吸附试验等方法, 研究了不同日龄 SPF 雏鸡人工感染 AEV - NH937 株后的血清 IgM、IgG 的动态变化规律。实验结果显示 IgM 在攻毒后第 3 天达到峰值 (0.57 mg/ml), 说明已有一部分 B 淋巴细胞分化为浆细胞并产生 IgM; IgG 从第 10 天开始呈上升趋势, 在第 20 天达到峰值 (5.05 mg/ml); 感染鸡外周血清中先出现 IgM, 后出现 IgG, 说明 IgM 为初级反应最早出现的免疫球蛋白, 在感染早期起着先锋免疫作用。当 IgG 出现后, IgM 的合成即受到抑制。抗 AEV 的血清 IgM 和 IgG 在时间上和强度上出现双峰现象。

关键词: SPF 雏鸡; 感染早期; IgM; IgG; 标准曲线

中图分类号: S 858.371.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009 - 3575 (2006) 04 - 0046 - 04

A STUDY ON CHANGING REGULARITY OF LGM AND LGG IN EARLY STAGE OF SPF CHICKEN INFECTED WITH AEV - 937 STRAIN

Zhaorigetu¹, MA Xue - en²

(1. Institute of Macromolecular Chemistry and Mongolian Medicine, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

(2. College of Animal Science and Medical Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: The pathological changes of lymphocytes and changing role of IgM, IgG from different days chickens infected with AEV - NH937 were systematically studied by viral inoculation of animal, pathological test and ELISA. Results showed that IgM, after 3 days of inoculation, reached to the highest level (0.57 mg/ml), which indicated that some of the plasma cells have produced IgM. IgG after the 10 day of inoculation, had a trend of increasing and reached to the highest level at 20 th day (5.05 mg/ml). It indicated that IgM, the immune globulin produced from the earlier reaction, play active role against the AEV - NH937 strain infection at the beginning of the disease. Synthesis of IgM was restrained after IgG was produced, because IgM antibodies were produced first in an immune response against AEV followed by a switch to IgG class.

Key words: Avian encephalomyelitis virus; SPF chickling; IgM; IgG; standard curve

引言

禽脑脊髓炎 (Avian Encephalomyelitis, AE), 又名流行性震颤 (Epidemic Tremor), 是由禽脑脊髓炎病毒 (AEV) 引起的以侵犯幼禽中枢神经系统为特征的传染病, 其具有证病意义的病理形态学变化是非化脓性脑脊髓炎。该病发病率为 40% ~ 60%, 死亡率为 25% 左右。成年鸡感染后出现产蛋率下降, 种蛋

出雏率降低^[1]。有关雏鸡感染 AEV 早期血清中的 IgM、IgG 变化规律尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 雏鸡 (SPF 种蛋孵化); SPF 种蛋购于中国兽药监察所 SPF 鸡场。

1.1.2 AEV 内蒙毒株 (AEV - NH937) 由内蒙古

* 收稿日期: 2006 - 10 - 20

作者简介: 昭日格图 (1969 -) 男 (蒙古族), 讲师, 硕士, 主要从事蒙药化学的教学与研究。

农业大学动物科学与医学学院禽脑脊髓炎课题组保存。

1.1.3 仪器 MS-353 型酶标分光光度计 (上海光学仪器厂产); Array 360 全自动特定蛋白分析仪 (美国贝克曼 - 库尔特公司产)

1.2 方法

1.2.1 雏鸡分组及处理 将 60 只 1 日龄 SPF 雏鸡分为两组, 攻毒组 40 只, 对照组 20 只。攻毒组于 1 日龄用禽脑脊髓炎病毒 (NH-937 株) 脑内接种, 每只为 0.03ml 组织毒。分别在攻毒后的第 1d、3d、5d、10d、14d、20d、30d 时取攻毒组 4 只, 对照组 2 只, 采血致死, 分离血清。

1.2.2 鸡血清 IgG 标准曲线的制备方法 (双抗体法) 取已知浓度的鸡 IgG (10mg/ml), 参考鸡正常 IgG 量 (3mg/ml~7mg/ml), 加保温液稀释成 8 个浓度梯度 (0mg/ml、0.5mg/ml、1.0mg/ml、2.0mg/ml、3.0mg/ml、4.0mg/ml、5.0mg/ml、6.0mg/ml), 用酶标分光光度计 (492nm 波长) 测 OD 值。以鸡 IgG 浓度为横坐标, 以其相对应的平均 OD 值为纵坐标, 来绘制鸡血清 IgG 的标准曲线。

1.2.3 测血清 IgG 浓度的方法 (双抗体法) 利用鸡血清 IgG 标准曲线, 即通过被检血清在同一实验条件下的 OD 值, 直接在标准曲线上查出相对应的 IgG 浓度 (mg/ml)。

1.2.4 测鸡血清 IgM 浓度的方法 IgM 是用全自动特定蛋白分析仪来检测的。其反应机制是试剂当与贝克曼特定蛋白分析器联合使用时, 通过比例能见度测试, 可以用于 IgM 的质量测定。具体原理是在 IgM 测试过程中, 在 1 个样品内抗 IgM (试剂中提供) 与 IgM 接触, 抗原 - 抗体复合物形成, 此复合物导致的轻散射上升转换成 1 个峰值信号 (这是样品 IgM 浓度所起的作用)。校正之后, 微粒散射的峰比值信号被分析器自动地转换成浓度单位。

1.2.5 攻毒组、对照组鸡血清 IgG、IgM 含量平均值差异显著性检验 利用 T 检验方法检验。

2 结果

2.1 鸡血清 IgG 标准曲线 OD 值
结果见表 1 及图 1。

表 1 鸡血清 IgG 标准曲线的制备方法测得结果

Tab 1 Data of chicken serum IgG for calibration curve

IgG 浓度 (mg/ml)	0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0
OD 值 (\bar{X})	0.377	0.612	0.749	0.760	0.773	0.805	0.820	0.873
标准差 (SD)	0.016	0.025	0.030	0.043	0.047	0.036	0.034	0.053

根据表 1 结果, 以鸡 IgG 浓度为横坐标, 以 OD 值为纵坐标, 制备出鸡血清 IgG 的标准曲线 (图 1)

2.2 被检血清 IgG 浓度结果

表 2 攻毒组与对照组在不同天数时的平均 OD 值

Tab 2 Mean OD values of control and treated groups in different days

攻毒后天数	第 1 d	第 3 d	第 5 d	第 10 d	第 14 d	第 20 d	第 30 d
平均 OD 值							
对照组	0.590	0.606	0.645	0.659	0.760	0.801	0.764
攻毒组	0.490	0.542	0.579	0.698	0.787	0.820	0.560

表 3 攻毒组与对照组在不同天数时在标准曲线上对应的 IgG 浓度 (mg/ml) 及差异显著性检验

Tab 3 Corresponding content of IgG of control and treated groups in different days and statistical differences between groups

攻毒后 d 数	第 1 d	第 3 d	第 5 d	第 10 d	第 14 d	第 20 d	第 30 d
对应浓度							
对照组	0.45	0.48	0.60	0.65	2.00	3.95	2.05
攻毒组	0.25	0.35	0.42	0.80	3.40	5.05	0.37
P 值	4.2/10 ⁶	4.9/10 ⁴	8.6/10 ³	3.8/10 ⁵ *	3.0/10 ⁷ *	1.7/10 ⁴ *	1.7/10 ⁶

注: * 代表攻毒组比对照组显著性, p 值小于 0.05 显著; 小于 0.01 为极显著

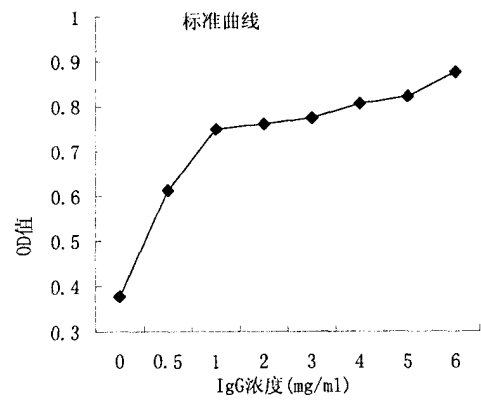


图 1 鸡血清 IgG 标准曲线
Fig. 1 Calibration curve of chicken serum IgG

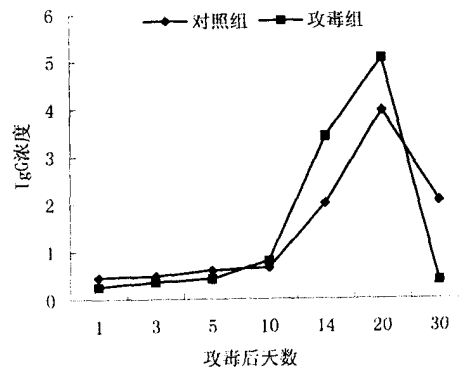


图 2 攻毒组和对照组血清 IgG 浓度 (mg/ml) 变化曲线
Fig. 2 Changing curve of content of serum IgG (mg/ml) of control and treated groups

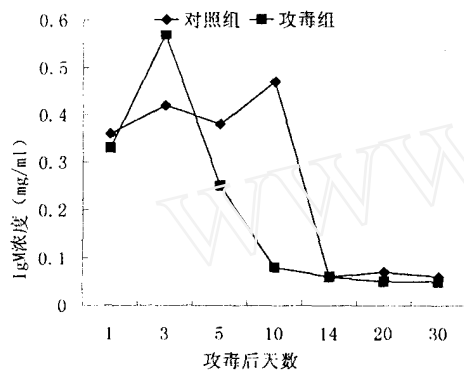


图 3 攻毒组和对照组血清 IgM 变化曲线
Fig. 3 Changing curve of content of serum IgM (mg/ml) of control and treated groups

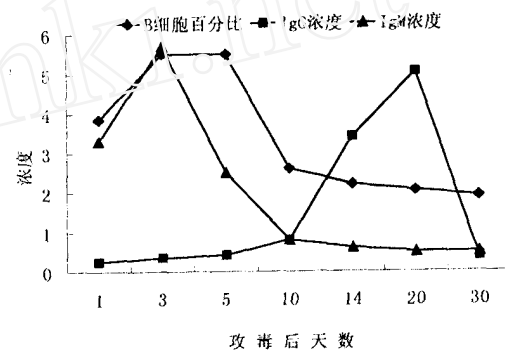


图 4 攻毒组鸡外周血 B 细胞百分比、IgG 浓度、IgM 浓度变化对照图
Chart of peripheral B cell percentage, content of serum IgG and IgM in treated chicken group

注: IgG、IgM 的浓度为 mg/ml, IgM 浓度在图中扩大 10 倍, B 细胞百分比单位为 %, 在图中缩小 2 倍

2.3 被检血清 IgM 浓度 (mg/ml) 的结果

表 4 攻毒组与对照组在不同天数时 IgM 平均浓度 (mg/ml) 及差异显著性检验

Table 4 Content of IgM of control and treated groups in different days and statistical differences between groups

攻毒后 d 数		第 1 d	第 3 d	第 5 d	第 10 d	第 14 d	第 20 d	第 30 d
平均浓度	对照组	0.36	0.42	0.38	0.47	0.06	0.07	0.06
	攻毒组	0.33	0.57	0.25	0.08	0.06	0.05	0.05
P 值		0.498	0.121	0.689	0.000 1	0.745	0.088 4	0.541

注: *代表攻毒组比对照组显著性, p 值小于 0.05 显著; 小于 0.01 为极显著

2.4 综合以上图 2、图 3, 并结合同时用流式细胞仪测得的外周血 B 细胞的百分比, 绘出同一攻毒组外周血 B 细胞百分比、IgM 浓度、IgG 浓度的变化规律图, 见图 4。

3 结论与讨论

3.1 用美国贝克曼 - 库尔特全自动特定蛋白分析仪检测 AEV - NH937 株感染 SPF 雏鸡外周血血清 IgM 的浓度。其变化规律是 IgM 第 3 d 达到峰值, 说

明此时已有一部分 B 细胞产生 IgM。

3.2 本实验用标准鸡血清的 IgG及标准兔抗鸡 IgG,利用 ELISA 实验来绘制 IgG浓度 - OD 值相关曲线,数据证明,标准差小即表明离散性小,方法准确,结果可信。

3.3 利用上述标准曲线,用 ELISA 方法检测 AEV - NH937株感染 SPF雏鸡外周血血清 IgG的浓度,其变化规律是在第 10 d呈上升趋势,第 20 d达到峰值说明 IgG起主力免疫作用。它不仅含量多,而且持续时间长,是抗感染免疫的主力,具有抗菌、抗病毒和抗外毒素等多种活性。

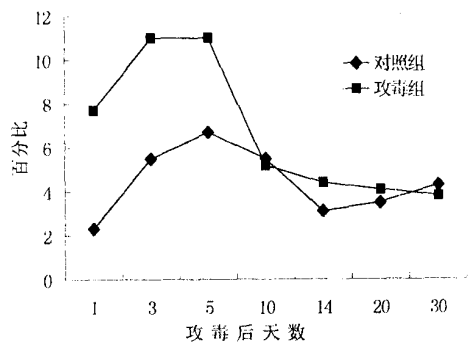


图 5 外周血 B 细胞的变化对照图

Fig 5 Chart of peripheral B cell percentage

3.4 我们利用酶标单克隆抗体技术和流式细胞仪技术,检测了这批实验动物和对照组雏鸡外周血 B 细胞的变化,其基本规律是 CD19细胞在攻毒后的第

5 d时达到峰值,其后下降,说明膜表面 CD19⁺标记减少,大多变为浆细胞,可产生抗体。本实验抗体检测结果支持上述结论。

3.5 总之,外周血 B 细胞、IgM、IgG的变化规律是,血液 CD19⁺细胞在攻毒后的第 5 d时达到峰值,其后下降说明 CD19⁺标记减少,大多变为浆细胞,可产生抗体。攻毒组 IgM第 3 d达到峰值,说明此时已有一部分 B 细胞产生 IgM。攻毒组 IgG在第 10 d呈上升趋势,第 20 d达到峰值。抗 AEV 的血清 IgM 和 IgG在时间上和强度上出现双峰现象。

3.6 本研究的实验数据证明,SPF雏鸡感染禽脑脊髓炎病毒早期,先出现 IgM,后出现 IgG, IgM 和 IgG 构成的体液免疫反应在抗 AEV 感染的早期发挥重要作用。

参 考 文 献:

[1] 赵振华,马学恩.禽脑脊髓炎发病机理和特异性病理诊断的研究[R]技术报告,1994,11.

[2] 马学恩.细胞黏附的研究进展[C]动物病理学研究专集.北京:中国农业大学出版社,1998

[3] 周顺伍.高级生物化学实验技术(上、下册)[M]北京:北京农业大学动物生化教研室,1980

[4] 王纯洁.博士学位论文[D]呼和浩特:内蒙古农业大学,2002

[5] 马学恩,赵振华.禽脑脊髓炎病毒的提纯和电镜观察[J]北京:中国兽医科技,1995,25(7):3-4.