

猪卵泡抑制素主动免疫对山羊生殖的影响

刘桂琼¹, 姜勋平¹, 丁家桐¹, 杨利国²

(1. 扬州大学畜牧兽医学院, 扬州 225009; 2. 南京农业大学动物科技学院, 南京 210095)

中图分类号: S828.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2003)01-0037-03

抑制素是由动物的性腺分泌的一种糖蛋白, 主要生理作用是反馈性抑制 FSH 的合成和分泌。用抑制素对动物进行主动免疫, 产生抑制素抗体中和内源性抑制素, 从而削弱或解除它对 FSH 分泌的抑制作用, 引起动物排卵数增加, 可能达到多产的目的。这种方法不仅与在生产和实验中广泛应用的促性腺激素处理一样可以提高动物的排卵率, 而且可以弥补促性腺激素处理个体反应不一的缺陷, 同时还能提高处理后几个胎次的产仔数, 这在畜牧生产中有重要的应用价值。为此, 本实验制备猪卵泡抑制素, 并用它免疫山羊, 探讨它用于提高家畜繁殖力的方法和可能性。

1 材料和方法

1.1 猪卵泡抑制素的制备 向猪卵泡液中缓慢加入-20℃无水乙醇, 乙醇与卵泡液最终比例为 2:18, 4℃冰箱过夜。10 000 g, 4℃离心 30 min, 弃上清。加入-20℃的丙酮涡旋离心, 弃上清, 重复 3 次。最后的沉淀冻干。将冻干物用 Sephadex G-100 过柱纯化。凝胶粒度 50~100 μ, 柱床大小 40 cm, 洗脱流速 30 ml/h。紫外分光光度计测定收集样品的蛋白质浓度。用 ELISA 法检测收集样品与抑制素抗体的免疫反应性。对具有抑制素免疫反应性的样品管进行合并, 冻干, 置-20℃冰箱备用。

1.2 抑制素主动免疫山羊 试验羊为 25 头母淮山羊, 体重 20~22 kg, 年龄约 10 月龄。试验前有过发情表现, 但未配种。免疫前两周用孕酮阴道海绵栓处理, 免疫前一天撤去海绵栓。采用半放牧半舍饲, 每天补饲混合精料 200 g。试验前两周驱虫。

抑制素免疫剂量为每头每次 2 mg。用尿素-醋酸钠缓冲液 (pH 4.0) 稀释抑制素制备物, 按 1:1

加入完全弗氏佐剂 (Sigma) 充分混合。在供试羊颈部两侧多点注射。首免后第 30 天进行第 1 次加强免疫, 第 50 天进行第 2 次加强免疫。加强免疫用不完全弗氏佐剂混合抑制素样品, 每头羊注射 1 mg 抑制素。对照组羊注射尿素-醋酸钠缓冲液和佐剂的混合物, 剂量和注射方法与试验组一样。

1.3 山羊血样制备和卵泡数测定 每次免疫前、最后 1 次加强免疫后第 8 天颈静脉采血, 肝素钠抗凝, 分离血浆, 置-20℃冰箱备用。最后 1 次免疫后第 3 周每只山羊注射氯前列烯醇 0.05 mg (上海计划生育研究所), 10 天后注射第 2 次。母羊第 1 次发情后手术摘取双侧卵巢, 计数黄体 and 发育卵泡数, 称卵巢重。卵巢活性=黄体数+大于 5 mm 卵泡数

1.4 抑制素抗体测定 免疫前、首免后 30 d、51 d、60 d 用琼脂双扩散法测定抑制素抗体效价。抗体测定时, 每块琼脂板上安排 5 头试验羊和 2 头对照羊血样。

1.5 山羊激素测定 用放射免疫法测定免疫前、首免后 30 d、51 d、60 d 血样促卵泡素 (FSH)。放免分析试剂盒购自中科院上海生化所, 在南京军区放免科测定。

1.6 统计分析 用非配对实验 t 检验比较分析试验组与对照组间 FSH 浓度、黄体数和卵泡数差异显著性。

2 结果

2.1 山羊血清抑制素抗体滴度 对照组 5 头羊的血浆中未检出抑制素抗体。20 头试验羊血浆抑制素抗体效价见表 1。首次免疫后 30 d 在血液中可以检测到抑制素抗体, 但抗体滴度较低, 加强免疫后血液中的抗体逐渐增加, 但个体差异较大, 有的个体抗体滴度较低, 两次加强免疫后仅有 1:16。

2.2 山羊卵巢活力 从表 2 可以看出, 抑制素免疫母羊后卵巢重量、大小、色泽等都属正常范围。卵巢

表 1 抑制素抗体效价
Table 1 Inhibin antibody titers after inhibin primary and boost injection

羊号 Goat Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
免疫前 Pre-immunization	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
加强免疫前 Pre-booster (首免 30 d)	1: 8	1: 8	1: 8	1: 16	1: 4	1: 8	1: 16	1: 4	1: 16	1: 4
二次加强免疫前 Pre-second booster(首免 50 d)	1: 16	1: 32	1: 16	1: 32	1: 8	1: 16	1: 32	1: 8	1: 64	1: 8
二次加强免疫后 Post-second booster(首免 60 d)	1: 32	1: 64	1: 32	1: 64	1: 16	1: 32	1: 64	1: 16	1: 256	1: 16
羊号 Goat Number	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
免疫前 Pre-immunization	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
加强免疫前 Pre-booster (首免 30 d)	1: 16	1: 8	1: 8	1: 16	1: 4	1: 8	1: 8	1: 16	1: 4	1: 16
二次加强免疫前 Pre-second booster(首免 50 d)	1: 64	1: 32	1: 16	1: 32	1: 8	1: 32	1: 16	1: 32	1: 8	1: 32
二次加强免疫后 Post-second booster(首免 60 d)	1: 128	1: 64	1: 32	1: 64	1: 16	1: 64	1: 32	1: 64	1: 16	1: 64

表 2 抑制素免疫后黄体数、卵泡数和卵巢重
Table 2 The number of corpora lutea, number of follicular and weight of ovary

	黄体数 No. CL	卵泡数 Number of follicular			卵巢活性 Activity of ovary	卵巢重 Weight of ovary
		> 5 mm	3~ 5 mm	< 3 mm		
试验组($\bar{x} \pm SD$) Treated group	2.25 \pm 0.63 ^a	0.85 \pm 0.58	6.32 \pm 2.65 ^a	12.14 \pm 3.23 ^a	3.1 \pm 0.84	1.27 \pm 0.48
对照组($\bar{x} \pm SD$) Control group	1.10 \pm 0.67 ^b	0.76 \pm 0.82	3.42 \pm 1.62 ^b	8.05 \pm 1.52 ^b	1.86 \pm 0.68	1.02 \pm 0.45

注: 同一列中字母不同表示差异显著。(P < 0.01)

Values at the same volume with different superscript differ significantly(P < 0.01).

重在免疫组和对照组间没有显著差异(P > 0.05)。

抑制素主动免疫显著提高了卵泡数(19.31 vs 12.23, (P < 0.01) 和黄体数(2.25 vs 1.10), 尤其是黄体数的增加使免疫母羊卵巢活性显著提高(P < 0.01), 试验组是对照组的 1.7 倍。

2.3 抑制素主动免疫对母羊 FSH 的影响 在免疫前和第 1 次免疫后, 试验组和对照组血浆 FSH 浓度差异不显著(分别为 1.24 vs 1.45, 1.28 vs 1.48)。在第 2 次免疫和第 3 次免疫后, 试验组和对照组血浆 FSH 浓度差异显著(分别为 1.92 vs 1.06, 2.02 vs 1.2)。说明试验组母羊在加强免疫后, FSH 浓度显著高于对照组。试验组首次免疫后母羊血浆 FSH 浓度略有升高, 经过两次加强免疫后显著升高(P < 0.05), 但两次加强免疫间 FSH 浓度没有显著的差异(P > 0.05)。

3 结论

本研究中用抑制素主动免疫母山羊, 首次免疫后血液中可以检测到抑制素抗体, 但抗体滴度较低, 加强免疫后血液中的抗体逐渐增加, 但个体差异较大。首免后抗体滴度低的个体加强免疫后抗体滴度也低。

抑制素首次免疫后母羊血浆 FSH 浓度略有升高, 经过加强免疫后显著升高(P < 0.05)。这是由于抑制素主动免疫后母羊体内产生了抑制素抗体, 中和了内源抑制素, 使血液中抑制素水平降低, 从而解除了抑制素对垂体分泌 FSH 的抑制作用, 使 FSH 分泌增加。需要说明的是, 本实验是用人的 FSH 测定试剂盒测定山羊的样品, 可能会有绝对浓度上的误差, 但对于试验组与对照组间的相对差异是准确的。

抑制素主动免疫后卵巢活性和排卵率增加了约 2 倍。这比文献报道的略高。说明用抑制素主动免

疫山羊,可以有效提高山羊的排卵率,这种方法有望成为提高山羊繁殖力的新技术。

Effects of Swine Ovary Inhibin Immunization on Goat Reproductive Traits

LIU Gui-qiong¹, JIANG Xun-ping¹, DING Jiar-tong¹, YANG Li-guo²

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009;

2. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Inhibin was purified from swine ovarian fluid by deposition and column deposition. The purified inhibin was diluted with urea-sodium-acetate, and then was mixed with Freund adjuvant with same volume. Each of the twenty goats was given subcutaneous injections of the purified inhibin 2 mg at neck. The goats were given booster-injections of the inhibin 1 mg that was mixed with urea-sodium-acetate and Freund incomplete adjuvant after 30 and 50 days. Five goats in control group were given admixture of urea and sodium acetate and adjuvant at the same time. The goats were injected with prostaglandin F_{2a} 0.05 mg at 21 d and 31 d after the last immunization. The blood samples were collected at 30 d, 51 d and 60 d after the first immunization and before immunization. The plasma FSH concentrates was assayed with RIA and the inhibin antibody titer was assayed with agar plate diffusion method. The plasma antibody titer was 1: 16-256 at 60 d after first immunization. The plasma FSH concentrates of the immunized goats was higher than those of the control group(2.02 vs. 1.2 mIU/ml, $P < 0.05$). The number of follicle and the number of corpora lutea of the immunized group were as twice as those of the control(19.31 vs. 12.23 and 2.25 vs. 1.10, respectively). It indicated that inhibin purified from swine ovarian fluid could induce goat produce high ovulation rate and it can improve reproductive traits of goat.

Key words: Inhibin; Active immunization; Ovulation Rate; FSH; Goat

下 期 目 次 预 告

1. 中型褐壳产蛋鸡实用饲料中锰适宜水平的研究
2. 不同饲养水平下灌注氨基酸对阉牛氮代谢的影响
3. 饲料铬对热应激肉仔鸡生长性能、血清生化特性和胴体品质的影响
4. 西藏牦牛、荷斯坦牛三个功能基因部分序列多态性的比较研究
5. 中亚以东南绵羊群体亲缘血统判别式的研究
6. 利用 24 个微卫星进行猪数量性状座位定位及其遗传效应分析
7. 仔猪骨骼肌注射 pGRF 基因质粒的促生长及代谢调控效应研究
8. CD58 与山羊早孕因子(EPF)之间关系的研究
9. 抑制素主动免疫后波尔山羊的排卵反应
10. 缺锌对雏鸭免疫功能影响的研究
11. 中药免疫增强剂对鸡 ILT 疫苗免疫和强毒攻击的影响
12. 减蛋综合征病毒六邻体蛋白基因的克隆和表达
13. 表达 MDVg B 和/或鸡 γ 干扰素基因的重组鸡痘病毒免疫效力试验
14. 应用噬菌体文库技术定位沙门氏菌鞭毛蛋白
15. 禽副粘病毒 2 型(PMV-2) 群特异性单克隆抗体的研究
16. 禽脑脊髓炎病毒单克隆抗体的制备及鉴定
17. 猪细小病毒 VP₂ 基因的克隆、测序与原核表达
18. 两株传染性法氏囊病毒 ϵ' 和 ϵ'' 非编码区结构分析
19. 猪大脑皮质、海马结构、梨状叶和杏仁核内 leptin 长形受体 mRNA 的分布定位