

梅花鹿生茸区骨膜细胞裂解液抗血清的制备

鲁晓萍, 褚文辉, 孙红梅, 王大涛, 刘琳玲, 赵海平, 李春义

(中国农业科学院特产研究所吉林省特种经济动物分子生物学重点实验室/吉林省特种经济动物分子生物学省部共建实验室, 长春 130000)

中图分类号: S865.4⁺2

文献标识码: B

文章编号: 1004-7034(2013)06-0153-03

关键词: 血清; 生茸区骨膜细胞; 裂解液

摘要: 为了制备高质量的兔抗梅花鹿生茸区骨膜细胞裂解液血清, 用于免疫学筛选 cDNA 表达文库, 试验采用淋巴结注射和背部皮下注射的方法制备了兔抗梅花鹿生茸区骨膜细胞裂解液血清。结果表明: 制备的抗血清效价是 1:128, 质量较高。

Preparation of the serum against the lysates of antlerogenic periosteal cells from sika deer

LU Xiao-ping, CHU Wen-hui, SUN Hong-mei, WANG Da-tao, LIU Lin-ling,

ZHAO Hai-ping, LI Chun-yi

(Jilin Provincial Key Laboratory for Molecular Biology of Special Economic Animals, Institute of Special Wild Economic Animal and Plant Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Jilin Provincial Laboratory for Molecular Biology of Special Economical Animals jointly built by Province and Ministry, Changchun 130000, China)

Key words: serum; antlerogenic periosteal cells; lysate

Abstract: To prepare high-quality rabbit serum against the lysates of antlerogenic periosteal cells from sika deer for immunological screening cDNA expression library, the methods of lymph node injection and back subcutaneous injection were used for preparing the antiserum. The result showed that the antiserum titer was 1:128, showing high quality.

梅花鹿生茸区骨膜组织是梅花鹿角柄组织发生所依赖的干细胞, 角柄中不同阶段的软骨及骨细胞均来源于这一细胞层的细胞, 该区域是鹿茸再生的关键点, 去除生茸区骨膜的梅花鹿终生不再生茸^[1-4]。但是目前对于梅花鹿生茸区骨膜细胞的作用机制研究不够透彻, 一方面梅花鹿生茸区骨膜的取材受时间限制, 是比较稀有的材料, 另一方面对梅花鹿生茸区骨膜分子作用机制的研究处于起步阶段, 该组织是否含有特殊的新基因还有待于进一步研究。研究是在培养梅花鹿生茸区骨膜细胞的基础上, 同时基于已经构建的梅花鹿生茸区骨膜细胞 cDNA 表达文库^[5]的基础上进行研究。

由于中国农业科学院特产研究所吉林省特种经济动物分子生物学重点实验室构建的梅花鹿生茸区

骨膜细胞 cDNA 表达文库, 是通过 λSCREEN 载体以融合蛋白的形式在宿主菌 BL21(DE) pLysE 中进行表达。该文库表达的融合蛋白氨基端为 β-半乳糖苷酶序列, 而羧基端为外源多肽, 噬菌体载体插入的 cDNA 片段最终以融合蛋白的形式表达, 蛋白保持原有的抗原性和生物活性, 因此可以用配体结合试验来筛选, 也就是免疫学筛选的方法^[6]。免疫学筛选 cDNA 表达文库的方法有许多优点, 它不需要了解蛋白质和核酸的序列及蛋白质的生物学功能^[7-8], 对于克隆那些含量低、纯化难度大的蛋白质 cDNA 克隆具有重要意义; 但是影响免疫学筛选的因素很多, 如 cDNA 表达文库和抗体的质量等。中国农业科学院特产研究所吉林省特种经济动物分子生物学重点实验室研究证实, 试验构建的梅花鹿生茸区骨膜细胞 cDNA 表达文库质量较高, 如果要对 cDNA 表达文库进行有效筛选就需要制备高质量的梅花鹿生茸区骨膜细胞裂解液抗血清。

1 材料与方法

1.1 试验动物及试剂

新西兰大白兔 6 只, 分别标记为 1 号、2 号、3 号、4 号、5 号、6 号, 由中国农业科学院特产研究所提供。鹿生茸区骨膜细胞, 由中国农业科学院特产研究所吉林省特种经济动物分子生物学重点实验室培养保存。

收稿日期: 2012-10-26; 修回日期: 2013-01-10

基金项目: “973”前期研究专项项目(2011CB111515); 国家自然科学基金项目(31070878); 吉林省自然科学基金项目(20101575)

作者简介: 鲁晓萍(1981-), 女, 研究实习员, 硕士, luxiaoping.fh100@yahoo.com.cn.

通信作者: 李春义(1959-), 男, 研究员, 博士, chunyi.li@agresearch.co.nz.

三羟甲基氨基甲烷 - HCl (Tris - HCl)、乙二胺四乙酸(EDTA)、D - Hank's 缓冲液、台盼蓝溶液、胰蛋白酶消化液、弗氏不完全佐剂(FIA)、弗氏完全佐剂(FCA)、芭比妥 - 芭比妥钠缓冲液,均由中国农业科学院特产研究所吉林省特种经济动物分子生物学重点实验室提供。

1.2 分离阴性对照血清

选取6只新西兰大白兔(体重为2.0~2.5 kg,明显可见耳静、动脉,健康),于梅花鹿生茸区骨膜细胞裂解液初次注射前采血,分离血清作为阴性对照。在此血清中加入叠氮钠至终浓度为0.02%,分装后-20℃保存,备用。

1.3 梅花鹿生茸区骨膜细胞裂解液的制备

采用D - Hank's 缓冲液冲洗进入对数生长期的梅花鹿生茸区骨膜细胞2次,加入0.25%胰蛋白酶消化液(含0.02% EDTA)消化细胞。加入含有胎牛血清的培养液制成细胞悬液,用台盼蓝溶液稀释10 μL细胞悬液,用血细胞计数板计数,离心沉淀。加入PBS制成细胞悬液,在液氮中快速反复冻融3次,然后在冰浴条件下超声波破碎2 s,间隔1 s,破碎10 min,4℃、12 000 × g离心15 min,取上清液,即为梅花鹿生茸区骨膜细胞裂解液,用微量蛋白检测仪检测裂解液蛋白浓度。

1.4 梅花鹿生茸区骨膜细胞裂解液的乳化

根据测得的细胞裂解液蛋白质浓度和免疫试验兔所需的蛋白量,分别取285 μL、114 μL、30 μL的细胞裂解液与等体积的FCA进行乳化。在加强免疫新西兰大白兔的同时将所取得的细胞裂解液与FIA等体积混合,进行乳化。

1.5 乳化液免疫新西兰大白兔制备血清

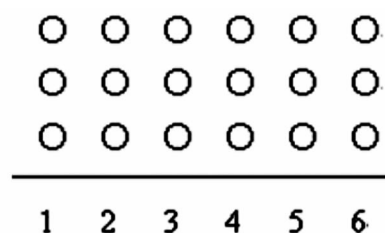
采取背部皮下多点注射和淋巴结免疫注射法(淋巴结免疫前1周先用FCA注射新西兰大白兔,使其致敏)给兔子注射乳化好的细胞裂解液,每只试验兔的免疫量为1 mL/次,每注射点量约为0.2 mL,于最后一次免疫2周后采血,分离血清,免疫程序见表1。

表1 新西兰大白兔的免疫程序

兔号	乳化液用量/ (μg · mL ⁻¹)	免疫部位	免疫 次数	间隔天数/d
1号	500	淋巴结注射	3	14, 14, 7
2号	500	背部皮下多点注射	3	14, 14, 7
3号	200	淋巴结注射	3	14, 14, 7
4号	200	背部皮下多点注射	3	14, 14, 7
5号	50	淋巴结注射	3	14, 14, 7
6号	50	背部皮下多点注射	3	14, 14, 7

1.6 新西兰大白兔抗梅花鹿生茸区骨膜细胞血清的特异性检测

采用对流免疫电泳方法检测,利用0.025 mol/L 巴比妥 - 巴比妥钠缓冲液配置1.5%琼脂,加入适宜浓度的叠氮钠,用于防腐;用5 mL移液枪吸取融化好的琼脂,浇铸到6块载玻片上;待琼脂凝固后,用打孔器在每个载玻片上打孔,孔径为3.5 mm,孔间距为4.0 mm,每排打3个,每行打6个,见图1。每只试验兔的多克隆抗血清设8个梯度,分别为2²、2³、2⁴、2⁵、2⁶、2⁷、2⁸、2⁹倍稀释,剩余的孔加入阴性血清作为对照。试验所用抗原为梅花鹿生茸区骨膜细胞裂解液,抗体为兔抗梅花鹿生茸区骨膜细胞裂解液血清。在抗原孔内加入梅花鹿生茸区骨膜细胞裂解液8 μL,其余孔加入不同稀释浓度的阳性抗血清8 μL。接通电源进行电泳,电流为2~3 mA/cm,电压为4~6 V/cm,通电45 min,观察结果。



1 3 5. 抗原; 2 4 6. 抗体。

图1 载玻片上琼脂打孔方式

2 结果与分析

2.1 梅花鹿生茸区骨膜细胞裂解液蛋白质的浓度

梅花鹿生茸区骨膜细胞裂解液蛋白质: OD₂₈₀/OD₂₆₀ = 0.883, 查得校正因子(F) = 0.682, 蛋白质浓度(mg/mL) = F × OD₂₈₀ × k。其中:k为稀释倍数。经计算,蛋白质浓度为1 770 mg/mL。将裂解液蛋白质放入-20℃冰箱保存,备用。

2.2 兔抗梅花鹿生茸区骨膜细胞裂解液阳性血清质量检测结果

经对流免疫电泳结果证实,免疫2号、3号试验兔制备的血清为阳性血清,具有明显的白色沉淀线,阴性血清及1 4 5 6号试验兔均没有白色沉淀线产生。由2号、3号试验兔制备的抗血清效价均为1:128,即抗血清稀释2⁷倍时满足试验要求。

3 讨论

梅花鹿生茸区骨膜细胞裂解液免疫试验兔制备抗血清的过程应该考虑许多因素,选择合适的动物进行免疫极为重要。此裂解液与免疫动物的种属差异越远越好,亲缘关系太近不易产生抗体应答。研究的目的是制备生茸区骨膜细胞裂解液抗血清,此外研究所需的抗血清量相对来说比较少,因此新西兰大白兔是最佳选择。注射生茸区骨膜细胞裂解液免疫试验兔的途径很多,但哪一种途径最有效目前尚未见报

道。研究采用皮下多点注射和淋巴结注射相结合的方法。

研究开始之前未见有关梅花鹿生茸区骨膜细胞裂解液免疫新西兰大白兔的报道,因此骨膜细胞裂解液免疫新西兰大白兔的最适剂量需要探索。研究在对新西兰大白兔注射之前对裂解液的剂量进行稀释,分别为500 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$,每种浓度注射量均为1 mL/次。

抗血清质量的检测方法有许多,研究采用对流免疫电泳的方法,此方法能够在短时间内观察到结果,灵敏度比双向琼脂扩散方法高10~15倍,抗血清在pH值为8.6的情况下带负电,因此点孔在正极,向负极移动,骨膜细胞裂解液在电渗的作用下与抗血清发生定向对流,在对流的过程中相遇形成白色沉淀线。此白色沉淀线可以用散射光进行多角度观察,在对孔之间有白色的沉淀线即为阳性血清。在多克隆抗体阳性血清的各稀释倍数中,无沉淀线出现的倍数为多克隆抗体阳性血清的效价。研究由对流免疫电泳结果证实,免疫2号、3号试验兔制备的血清为阳性血清,同时证实研究制备的阳性血清效价较高。因此,500 $\mu\text{g/mL}$ 的骨膜细胞裂解液采用背部皮下多点注射途径和200 $\mu\text{g/mL}$ 的骨膜细胞裂解液采用淋巴

结免疫途径效果较好,得到的抗血清质量较高,能用于cDNA表达文库进一步筛选。

参考文献:

- [1] LI C, SUTTIE J M. Deer antlerogenic periosteum: a piece of postnatally retained embryonic tissue [J]. Anat Embryol, 2001, 204: 375-388.
- [2] GOSS R J, POWEL R S. Induction of deer antlers by transplanted periosteum I. Graft size and shape [J]. Exp Zool, 1985, 235: 359-373.
- [3] LI C, YANG F, SHEPPARD A. Adult stem cells and mammalian neomorphic regeneration insights from studying annual renewal of deer antlers [J]. Current Stem Cell Res, 2009, 4(3): 237-251.
- [4] KIERDORF U, LI C, PRICE J S. Improbable appendages: Deer-antler renewal as a unique case of mammalian regeneration [J]. Semin Cell Dev Biol, 2009, 20(5): 535-542.
- [5] 鲁晓萍. 梅花鹿生茸区骨膜干细胞 cDNA 表达文库的构建 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2009(3上): 115-117.
- [6] 赵海平. 青海血蜱幼蜱 cDNA 表达文库的构建及其保护性抗原基因的免疫学筛选 [J]. 中国兽医科学, 2007, 37(6): 461-464.
- [7] 杨晓明. 人胎肝细胞 cDNA 文库的免疫学筛选 [J]. 免疫学杂志, 1996, 12(2): 78-81.
- [8] 陈奕慧. 兔抗鼠 TGF- β 1 抗体对日本血吸虫囊尾蚴 cDNA 文库的免疫学筛选 [J]. 中国现代医药杂志, 2006, 12(8): 58-60.

(015)

新西兰白兔胚胎分割的研究

周俊波¹, 胡乐佳¹, 傅广取¹, 陈丽², 王杏龙²

(1. 湖州师范学院 生命科学学院, 浙江 湖州 313000; 2. 扬州大学 动物科技学院, 江苏 扬州 225009)

中图分类号: S829.1

文献标识码: B

文章编号: 1004-7034(2013)06-0155-03

关键词: 胚胎分割; 体外培养; 新西兰白兔

摘要: 为了研究不同时期胚胎分割后新西兰白兔胚胎在不同培养液中的发育情况, 试验采用徒手分割法对8-细胞胚、桑葚胚、囊胚进行分割, 并研究分割后半胚的发育情况。结果表明: 囊胚的分割效果好于8-细胞胚和桑葚胚, 各时期胚胎分割后半胚体外培养发育至囊胚率分别为42.0%(8-细胞胚)、75.2%(桑葚胚)、65.1%(囊胚); 3个时期半胚在3种培养液中的发育状况均为DMEM优于TCM-199, TCM-199优于PBS; 去除黏蛋白层的桑葚胚、囊胚分割成功率比未去除黏蛋白层的高。

胚胎分割是20世纪80年代发展起来的一种胚胎生物学新技术, 采用显微外科手术或徒手操作方法, 切割早期胚胎, 制造同卵多仔后代。目前, 已在小

鼠、绵羊、山羊、马、牛及猴等动物中获得成功^[1-6]。1968年, N. W. Moore等^[7]研究兔的胚胎分割, 由于兔胚胎外层具有特殊的黏蛋白层, 增加了兔胚胎分割操作的难度, 因此国内有关兔胚胎分割的研究较少。试验参照国内外其他动物胚胎的分割技术, 对新西兰白兔胚胎进行分割, 探索分割后的各期半胚在不同条件下的发育情况, 最终获得更加完善、易于操作的兔胚胎分割技术。

1 材料与方法

收稿日期: 2012-10-29; 修回日期: 2012-12-04

基金项目: 湖州师范院校级项目(KX23063)

作者简介: 周俊波(1979-), 男, 实验师, 硕士, zhoujunbo@hute.zj.cn.

通信作者: 王杏龙(1958-), 男, 教授, 博士。