



卵黄 抗体技术

张小莺

Zhang Xiaoying

陈琛

Chen Chen

编著



科学出版社



1111

11111111

000

1111
11111111
1111

00000000

1111

0000



11111111

00000000

11111111

00000000

卵黄抗体技术

张小莺 陈琛 编著

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书是我国首部关于卵黄抗体技术的专著，具有结构紧凑、实用性强、信息量大等特点。全书共三篇分为八章，第一篇主要介绍卵黄抗体技术的理论背景，包括禽类的免疫系统与抗体发生机制、卵黄抗体的抗体特性与优势、多克隆及单克隆卵黄抗体；第二篇为实用的实验室操作指南，涉及了实验动物的饲养、免疫方案的确立、卵黄抗体的提取纯化技术、各种抗体研究与应用所必需的免疫学和生物技术方法的介绍，并提供可供参考的操作规程；第三篇收集整理了近年来国内外卵黄抗体技术的研究、开发应用的最新进展和成就与典型科研案例，并就该技术的现状与前景，提出了作者的观点。书中各章节紧密联系，便于读者通过简捷的方式了解卵黄抗体技术。

本书为从事该技术领域的专业人员提供了非常实用的技术和方法，可作为日常工作手册使用。同时可作为药学、兽医学、食品学及生物技术相关领域研究人员的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

卵黄抗体技术/张小莺,陈琛编著.—北京:科学出版社,2011.5

ISBN 978-7-03-030902-0

I.①卵… II.①张… ②陈… III.①抗体-研究
IV.①Q939.91

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 074587 号

责任编辑:张 珏 / 封面设计:陈思思

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

四川煤田地质制图印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2011年5月第 一 版 开本:720×1000 B5

2011年5月第一次印刷 印张:15.5

印数:1—1 200 字数:300千字

定价:68.00元

前 言

卵黄抗体技术始于 1893 年德国莱比锡医生 Klemperer F. 的经典实验, 即经过免疫的母鸡所产蛋的卵黄中存在具有能对免疫原产生特异性中和活性的蛋白质, 即后来所说的卵黄抗体。然而, 和其他经常发生于科学史的情况类似, 这一发现长时间以来被人们所忽视。直到 20 世纪 80 年代, 随着科研与生产领域对抗体需求的日益增加, 以及对实验动物保护呼声的不断高涨, 这一经典实验才重新回到人们的视野, 并日益得到重视。

在国际上, 自卵黄抗体技术于 1996 年获得确认以来, 该技术已有长足发展, 它已经与基因工程技术、噬菌体展示技术、磁珠技术、免疫检测技术等多种当前主流的抗体技术与生物技术相结合, 应用于病原体检测、诊断, 抗生物恐怖袭击, 饲料与食品添加剂, 新药与新兽药开发, 食品工程及快速大量生产科研用抗体等方面。与此同时, 它还带来了动物福利和经济优势以及技术简便性。近年来, 该技术被越来越多的国家与国际专业机构采用和推荐, 并且在美国、日本、德国、韩国等国不断有卵黄抗体产品上市。

在我国, 卵黄抗体技术的引入与应用已有几十年的时间, 尤其在兽医领域取得不小的进展, 如用卵黄抗体治疗鸡的法氏囊病有特效并早已获得广泛应用。我国学者还成功开发出抗蛇毒、抗 SARS 等的特异性卵黄抗体。但由于各种原因, 卵黄抗体技术在抗体工程中一直处于边缘地位, 人们对该技术的作用与意义未能充分的认识。同时, 该技术与其他抗体与生物、医药技术未能很好的结合起来, 对现有的技术环节又缺乏相应技术标准。另外, 在我国科研界, 长期以来缺乏对动物福利的保护意识与压力。这些都影响了人们对该技术的认识与拓展、应用。

本书作为我国第一部卵黄抗体技术专著, 通过三篇共八章内容, 对卵黄抗体技术进行了全面、系统的介绍。

第一篇是卵黄抗体技术理论背景，介绍了鸟类的免疫系统与抗体发生机制、卵黄抗体的抗体特性与优势、多克隆及单克隆卵黄抗体。

第二篇是卵黄抗体技术与实验方法，涉及实验动物的饲养、免疫方案的确立、卵黄抗体的提取纯化技术、各种抗体研究与应用所必需的免疫学和生物技术方法的介绍，卵黄抗体技术与其他技术的交叉等，并提供可供参考的操作规程。

第三篇是卵黄抗体技术的应用，总结了近年来国内外卵黄抗体技术相关研发、应用状况和典型科研案例，并就该技术的现状与前景、抗体研发思路、技术应用趋势与建议提出了作者的观点。书中的一系列章节紧密联系，便于读者通过简捷的方式了解卵黄抗体技术。

我们衷心希望本书能够促进该技术在国内推广和实施，加强与同行之间的交流并达成学术共识，共同推动该技术在我国的进步与发展。希望本书能帮助那些在这项技术上尚缺乏经验的研究人员和实验室相对容易的了解该技术，应用和发展该技术。

我们也意识到，本书会存在某些不足与缺憾。因此，对书中可能出现的不足表示歉意，敬请同行专家及广大读者提出宝贵意见和建议。

本书由张小莺（西北农林科技大学）和陈琛（陕西理工学院）编著。在撰写过程中，研究生赵津子、齐宝珠、田泽华、韩水仲和陈红秀分担了部分章节的资料整理工作，在此向他们深表谢意！

衷心感谢科学出版社对本书的出版给予大力支持！

张小莺

2011年5月

目 录

第一篇 卵黄抗体技术理论基础	(1)
第 1 章 鸟类免疫系统与抗体发生机制概述	(3)
1.1 鸟类免疫系统简介	(3)
1.1.1 鸟类发生学	(3)
1.1.2 鸟类免疫系统特征	(4)
1.1.3 免疫分子	(12)
1.2 鸟类抗体的发生与分化	(15)
1.2.1 鸟类抗体发生与分化机制	(15)
1.2.2 卵黄抗体在抗体进化中的地位	(18)
1.2.3 卵黄抗体在物种间的差异性	(20)
参考文献.....	(21)
第 2 章 卵黄抗体特征	(24)
2.1 卵黄抗体技术发展简史	(24)
2.2 卵黄抗体转运机制	(26)
2.2.1 鸡的生殖系统与卵的形成	(27)
2.2.2 抗体转运入卵的多种途径	(27)
2.2.3 参与卵黄抗体转运的受体	(27)
2.3 卵黄抗体特性分析	(31)
2.3.1 IgY 与 IgG 的分子结构比较	(31)
2.3.2 卵黄抗体的理化特性	(34)
2.3.3 卵黄抗体的药剂学研究	(36)
2.3.4 卵黄抗体优势分析	(37)
参考文献.....	(40)
第 3 章 卵黄抗体的研发模式	(43)

3.1 多克隆卵黄抗体	(43)
3.1.1 多克隆卵黄抗体的应用	(43)
3.1.2 多克隆卵黄抗体的制备	(43)
3.2 基因特异性卵黄抗体	(44)
3.3 单克隆卵黄抗体	(46)
3.3.1 单克隆卵黄抗体产生的理论基础	(46)
3.3.2 单克隆卵黄抗体研究现状	(47)
参考文献	(50)
第二篇 卵黄抗体技术与实验方法	(53)
第4章 蛋鸡的饲养与免疫	(55)
4.1 蛋鸡的饲养	(55)
4.1.1 蛋鸡的笼养方式	(55)
4.1.2 蛋鸡的饲养环境	(57)
4.2 SPF 蛋鸡	(57)
4.3 免疫方法的选择与变量控制	(60)
4.3.1 实验蛋鸡的选择	(60)
4.3.2 抗原剂量控制	(61)
4.3.3 佐剂的使用	(61)
4.3.4 抗原的施用途径	(62)
4.3.5 免疫间隔	(64)
4.3.6 免疫变量的互动影响	(64)
4.3.7 卵黄抗体浓度变化	(64)
4.3.8 免疫行为对鸡产蛋能力的影响	(65)
4.3.9 蛋鸡生物节律对抗体产量波动的影响	(65)
4.4 实验动物保护与使用相关法规与机构	(67)
4.4.1 国外情况	(67)
4.4.2 国内情况	(68)
参考文献	(69)
第5章 卵黄抗体的提取与分离纯化方法	(72)
5.1 鸡蛋与卵黄结构及组分	(73)

5.1.1	鸡蛋结构及组成	(73)
5.1.2	卵黄成分	(75)
5.2	卵黄抗体的提取技术	(76)
5.2.1	卵黄收集方法	(76)
5.2.2	冻融法	(77)
5.2.3	透析法	(77)
5.2.4	超临界流体提取法	(78)
5.2.5	盐析法	(79)
5.2.6	超滤法	(82)
5.2.7	介体电泳技术	(87)
5.2.8	双向凝胶电泳技术	(89)
5.3	卵黄抗体分离方法	(90)
5.3.1	聚乙二醇沉淀法	(90)
5.3.2	聚乙二醇/乙醇沉淀法	(92)
5.3.3	硫酸葡聚糖沉淀法	(93)
5.3.4	氯仿/聚乙二醇法	(95)
5.3.5	有机溶剂抽提法	(96)
5.3.6	水稀释法	(98)
5.3.7	天然胶法	(100)
5.3.8	特殊化学物提取法	(100)
5.3.9	去污剂提取法	(101)
5.4	卵黄抗体纯化方法	(102)
5.4.1	凝胶过滤色谱	(102)
5.4.2	离子交换层析	(106)
5.4.3	亲和层析	(108)
5.4.4	疏水层析	(113)
5.5	分离提取纯化方法的比较及综合应用	(114)
5.5.1	特异性卵黄抗体的提取量分析	(114)
5.5.2	各种提取、分离纯化方法的比较及应用	(114)
5.5.3	卵黄抗体分离提取纯化相关市售产品	(116)
	参考文献	(117)

第 6 章 卵黄抗体检测技术与方法	(123)
6.1 免疫沉淀反应	(123)
6.1.1 概述	(123)
6.1.2 单向琼脂扩散实验	(124)
6.1.3 双向琼脂扩散实验	(126)
6.1.4 免疫电泳	(127)
6.1.5 火箭免疫电泳	(128)
6.1.6 对流免疫电泳	(130)
6.2 免疫荧光技术	(132)
6.2.1 概述	(132)
6.2.2 实验方法	(132)
6.3 ELISA 方法	(135)
6.3.1 概述	(135)
6.3.2 间接 ELISA 测定抗体法	(136)
6.3.3 双抗体夹心 ELISA 法测抗原	(137)
6.3.4 竞争法	(138)
6.3.5 捕获 ELISA	(139)
6.3.6 注意事项	(140)
6.4 免疫印记法	(141)
6.4.1 实验原理	(141)
6.4.2 实验方法	(141)
6.5 免疫组化技术	(144)
6.5.1 实验原理	(144)
6.5.2 实验方法	(144)
6.6 流式细胞术	(145)
6.6.1 实验原理	(145)
6.6.2 实验方法	(145)
6.7 补体结合实验	(147)
6.7.1 实验原理	(147)
6.7.2 实验方法	(148)
6.8 免疫胶体金技术	(149)

6.8.1 实验原理	(149)
6.8.2 实验方法	(150)
6.9 免疫电镜技术	(152)
6.9.1 实验原理	(152)
6.9.2 实验方法	(152)
参考文献	(153)

第三篇 卵黄抗体技术的应用..... (157)

第7章 卵黄抗体技术在医药领域的应用..... (159)

7.1 在疾病诊断、检测中的应用.....	(159)
7.1.1 检测病原体	(159)
7.1.2 在检测诊断新领域的应用	(161)
7.2 预防及治疗口腔、咽喉疾病.....	(164)
7.2.1 口腔疾病	(164)
7.2.2 咽喉疾病	(166)
7.3 预防及治疗胃肠道疾病	(167)
7.4 作为食品添加剂与功能食品	(168)
7.5 作为饲料添加剂	(168)
7.5.1 在仔猪生产中的应用	(169)
7.5.2 在养禽上的应用	(171)
7.6 预防及治疗水产动物疾病	(173)
7.6.1 细菌性水产疾病	(175)
7.6.2 病毒性水产疾病	(176)
7.6.3 在水产疾病诊断中的应用	(177)
7.7 预防及防治牛乳房炎	(178)
7.8 在病毒性疾病方面的应用	(179)
7.8.1 预防及治疗传染性非典型肺炎	(179)
7.8.2 预防及治疗生殖器疱疹病毒	(180)
7.8.3 预防及治疗猪繁殖和呼吸综合征	(181)
7.8.4 预防及治疗猪瘟	(181)
7.8.5 预防及治疗牛病毒性腹泻病	(182)

7.8.6	预防及治疗口蹄疫	(183)
7.8.7	预防及治疗蓝舌病	(183)
7.8.8	预防及治疗犬细小病毒病	(184)
7.8.9	预防及治疗狂犬病	(185)
7.8.10	预防及治疗犬瘟热	(186)
7.8.11	预防及治疗水貂肠炎病毒	(187)
7.8.12	预防及治疗传染性法氏囊病	(187)
7.8.13	预防及治疗鸡新城疫	(188)
7.8.14	预防及治疗流感病毒	(189)
7.8.15	预防及治疗鸭肝炎病毒	(190)
7.8.16	预防及治疗小鹅瘟	(190)
7.8.17	预防及治疗朊病	(191)
7.9	预防及治疗真菌感染	(192)
7.10	治疗及检测寄生虫类疾病	(193)
7.11	治疗及检测蛇毒疾病	(196)
7.12	抑制肿瘤	(197)
7.13	协助人类免疫避孕	(198)
7.14	治疗囊肿性纤维化	(199)
7.15	防止器官移植排斥反应	(199)
7.16	协助生物反恐	(200)
7.17	替代抗生素	(200)
7.18	蛋白质组学中的应用	(201)
	参考文献	(201)
第8章	卵黄抗体技术前景展望	(211)
附录1	卵黄抗体技术中常用溶剂配制方法	(215)
附录2	单克隆卵黄抗体的研发案例	(220)
附录3	饲养 SPF 鸡所需软、硬件设施,技术环节与标准	(226)
附录4	部分商业化的 IgY 产品介绍表	(233)

第一篇

卵黄抗体技术理论基础

第 1 章 鸟类免疫系统与 抗体发生机制概述

免疫系统 (immune system) 是由机体中主宰或执行免疫功能的器官、细胞和分子所组成的一个系统的总称。在解剖学上, 免疫系统由淋巴器官及淋巴组织组成, 其功能是由各种免疫细胞的协同作用完成。免疫系统是机体在同体内外各种环境因素在长期相互适应、相互斗争过程中, 逐渐建立和发展起来的, 其各组部分功能的正常运作才能保证机体免疫功能稳定。

1.1 鸟类免疫系统简介

1.1.1 鸟类发生学

鸟类由爬行动物进化而来, 是一支适应飞翔、高度特化的脊椎动物类群。鸟类在躯体结构和功能方面有很多类似爬行类的特征, 同时, 鸟类具有以下几个进步性特征:

- ①具有高而恒定的体温 ($37.0\sim 44.6^{\circ}\text{C}$), 减少了对环境的依赖;
- ②具有迅速飞翔的能力, 能借主动迁徙来适应多变的环境条件;
- ③具有发达的神经系统和感官, 能更好的协调体内外环境;
- ④具有较完善的繁殖方式和行为, 保证了后代有较高的成活率。

如图 1.1 所示, 以鸡为代表的鸟纲和以人和兔为代表的哺乳纲在同属脊椎动物的前提下, 又具有足够的遗传距离与差异。这一特点是卵黄抗体具有某些抗体优势的重要生物学基础与前提。

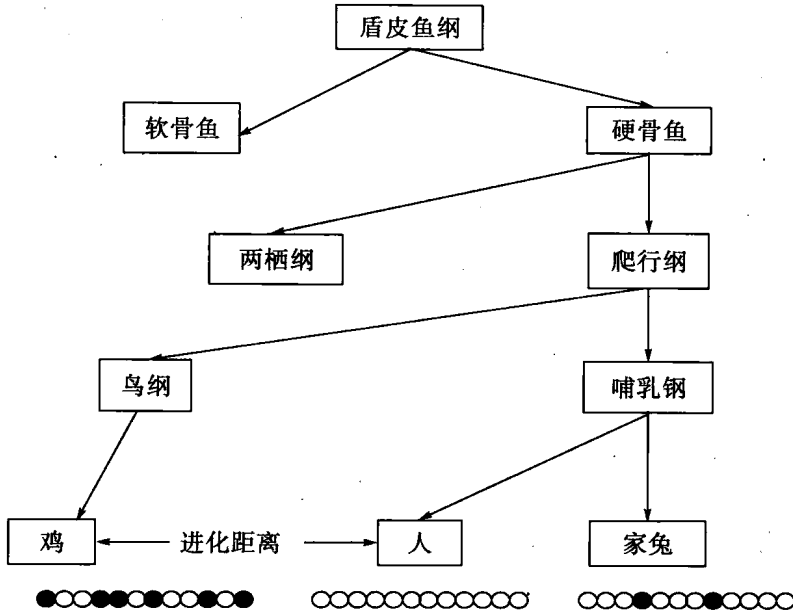


图 1.1 脊椎动物进化树

注：黑点代表氨基酸差异

1.1.2 鸟类免疫系统特征

鸟类免疫系统的构成很复杂，包括免疫器官、细胞和化学介质，根据免疫发生特征分为先天性免疫系统和获得性免疫系统。

先天性免疫系统是免疫防护的初始屏障，在鸟类孵化后，很快存在并发挥作用，表现出反应的非特异性、反应速度相对滞后以及效率较低等特点。

获得性免疫系统由体液免疫和细胞免疫组成，其免疫应答的类型在鸟类分为法氏囊源性和胸腺源性。获得性免疫表现出反应特异性，且具有记忆性等特点，这使得鸟类在回应特定抗原的第二次免疫应答中，能够更快速和有效。

1.1.2.1 免疫器官 (immune organ)

免疫器官是淋巴细胞和其他免疫细胞发生、分化、成熟、定居和增殖以及产生免疫应答的场所。根据其功能可分为中枢免疫器官和外周免疫器官。中枢免疫器官包括骨髓、胸腺、腔上囊，它控制着机体的免疫反应，可赋予

小淋巴细胞免疫功能，使其成为 T、B 淋巴细胞，但不参与免疫应答；外周免疫器官，包括淋巴结和脾等，它是免疫活性细胞定居、增殖及与抗原发生应答的场所。

1. 中枢免疫器官

(1) 胸腺 (thymus)：胸腺位于颈部气管的两侧或胸腔的前下方，紧贴颈静脉，淡红色、扁平不规则叶状结构，成对排列，沿颈部延伸至胸，属于初级淋巴器官。胸腺实质被结缔组织分隔成许多胸腺小叶。胸腺能促进淋巴细胞发育成熟并诱导其产生胸腺激素及其他激素类物质，是鸟类 T 淋巴细胞分化和成熟的场所。胸腺在动物性成熟时体积最大，随着性发育而不断退化。

(2) 法氏囊 (bursa of Fabricius) 又称腔上囊：位于泄殖腔的背侧，呈球形结构，分皮质和髓质，是鸟类特有的免疫器官。法氏囊的结构由内向外依次为黏膜、黏膜下层、肌层和外膜，参见图 1.2。它是在受精卵孵育到 6~7 天后，由淋巴滤泡发育而来，孵育的第 12 天起，在囊内出现 B 淋巴系干细胞，第 17 天左右法氏囊发育成熟，在鸡 3~4 月龄时，法氏囊生长到最大重量，约 3~4g。性成熟（约在 4~4.5 月龄）以后开始退化，到 12 月龄后基本完全消失。法氏囊与体液免疫有关，是 B 淋巴细胞分化、成熟的场所。

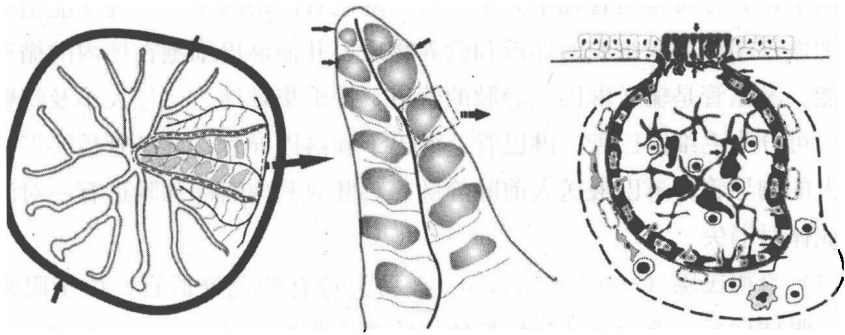


图 1.2 法氏囊结构

(3) 骨髓 (bone marrow)：主要的造血器官，是各类血细胞的发源地。鸟类胚胎期血细胞生成场所最早在卵黄囊，后移至胚肝和胚脾，最后由骨髓替代。血细胞的“祖先”是多能干细胞，增殖分化为淋巴系或髓系干细胞，最后再增殖分化为单能干细胞或前体细胞进入血流。鸟类的 B 淋巴细胞前