

免疫透射比浊法检测牛初乳 IgG 的研究

姜瞻梅¹, 吴 刚¹, 王 静², 田 波¹

(1. 东北农业大学 乳品科学教育部重点实验室, 东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030;

2. 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京 100081)

摘 要: 建立了定量测定牛初乳 IgG 的免疫透射比浊法, 确定该检测方法的最佳反应温度 37℃, 检测时间 40min, 浓度在 0.07~0.75mg/ml 范围内线性关系良好。该方法准确性好, 回收率高, 与火箭免疫电泳法比较, 测定结果差异不显著, 这说明免疫透射比浊法检测 IgG 含量具有良好的可靠性。

关键词: 免疫透射比浊法; IgG; 牛初乳

Study on Bovine Clostrum ImmunoglobulinG Determination by Immunoturbidimetry Method

JIANG Zhan-mei¹, WU Gang¹, WANG Jing², TIAN Bo¹

(1. Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, College of Food Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China 2. Center for Agricultural Quality Standard and Detection, Chinese Agricultural Science, Beijing 100081, China)

Abstract: Immunoturbidimetry method was developed to determine the bovine colostrum IgG concentration. IgG was assayed by immunoturbidimetry with the reaction temperature 37℃ and reaction time 40 min, and with good linear relation ranged from 0.07 mg/ml to 0.75mg/ml. The immunoturbidimetry method showed good repeatability and stability in comparicon with the rocket immunity electrophoresis analysis, immunoturbidimetry method shows better reliability.

Key words: immunoturbidimetry; IgG; bovine colostrum

中图分类号: TS252.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)03-0298-03

免疫球蛋白 IgG 作为牛初乳中重要的免疫因子, 其含量的多少已经成为衡量牛初乳及其产品优劣的一个重要指标^[1-3]。因此, 在牛初乳的收集和加工过程中往往需要对初乳及其制品中的 IgG 含量进行快速准确的检测。目前我国对牛初乳 IgG 的检测方法有单向免疫扩散法、火箭免疫电泳法等, 其缺点为检测时间长、测定误差大、检测结果滞后^[4-7]。为了解决这一难题, 本研究选择免疫透射比浊法快速检测牛初乳中 IgG 含量, 其检测时间短、操作简便、对设备要求不高, 更适合实际生产的要求。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牛乳制品 市售。标准牛 IgG、兔抗牛 IgG 抗体 美国 Sigma 公司; 聚乙二醇(PEG, 分子量 6000) 宝泰克公司。

1.2 仪器

GF-D800 半自动生化分析仪 山东高密彩虹分析仪器有限公司; XW-80A 型旋涡混合器 上海医科大学仪器厂; 不锈钢电热恒温水浴锅 天津市泰斯特仪器有限公司; Delta320pH 计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫透射比浊法操作步骤

将抗体液进行 20 倍的稀释, 向各个反应管中加入 210μl 的稀释抗体液。将样品采用 PEG 比浊缓冲液作适当比例稀释, 然后取 12μl 加入各个反应管, 混匀后置水浴反应。以 PEG 比浊缓冲液作空白对照进行调零, 半自动生化分析仪于 340nm 波长下测定其吸光度。

1.3.2 牛初乳样品的检测

首先采用 PEG 比浊缓冲液将牛 IgG 标准品配制不同浓度溶液, 按照上述免疫透射比浊法操作步骤测定其吸光值, 绘制出牛 IgG 标准曲线。然后再将牛初乳样品用 PEG 比浊缓冲液稀释成 1mg/ml 的溶液, 取 12μl 牛初

收稿日期: 2007-01-25

基金项目: 2007 年农业行业标准制定项目; 乳品科学教育部重点实验室主任基金项目(KLDS2006-0153)

作者简介: 姜瞻梅(1976-), 女, 讲师, 博士, 研究方向为乳品科学与技术。E-mail: jiangzhanmei@163.com

乳样品液与210 μ l 稀释抗体液充分混匀,然后置水浴反应,当反应结束后采用半自动生化分析仪在340nm波长下测定其吸光度,根据牛IgG标准曲线计算出牛初乳样品中的IgG含量。

1.3.3 与火箭免疫电泳法比较^[8]

分别用免疫透射比浊法和火箭免疫电泳法对同一样品进行重复检测,比较两种方法的差异性。

2 结果与分析

2.1 抗原抗体浓度的选择

根据预试验结果,确定抗体的稀释浓度为20倍稀释,每个反应管加样量为210 μ l。固定抗体的浓度及用量,抗原作梯度稀释。以抗原浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制曲线如图1所示。从图1可知,随着标准IgG抗原浓度增加,反应液的吸光度逐渐增大,但随着抗原浓度继续增大时,反应液的吸光度却逐渐降低。根据曲线可知,抗原浓度在0.1~0.6mg/ml之间线性关系较好,为本方法中的标准IgG抗原的最合适浓度范围。

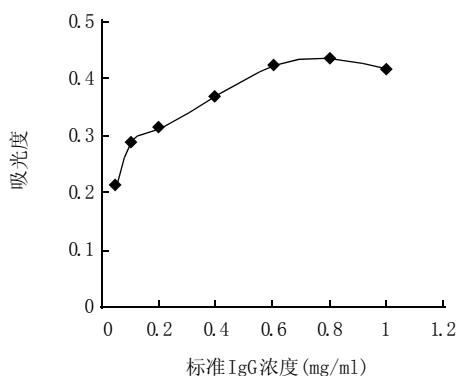


图1 抗原与吸光度的关系

Fig.1 Relation between antigen and absorbation

2.2 最佳反应温度的选择

本实验分别在温度25℃和37℃条件下,对0.4mg/ml的标准IgG进行检测。表1的T检验结果证实,在反应温度为25℃和37℃条件下,反应液的光密度测定值差异极显著($p < 0.01$)。从快速达到反应平衡的角度,本实验选择最佳反应温度为37℃。

表1 温度对反应的影响 ($\bar{X} \pm SD$)

Table 1 Effects of temperature on reaction ($\bar{X} \pm SD$)

反应温度(℃)	吸光度
25	0.301 \pm 0.003 ^a
37	0.317 \pm 0.002 ^b

注: T检验 $\alpha=0.01$; 同一列数据中,字母相同表示差异不显著,不同表示差异显著。

2.3 反应时间的选择

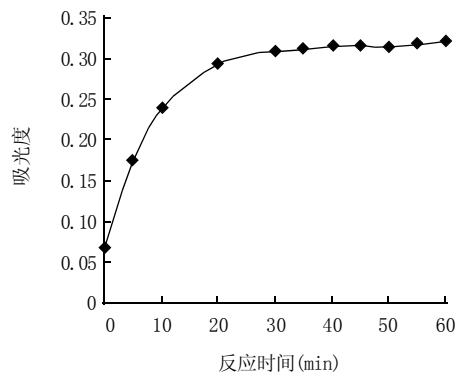


图2 反应时间曲线

Fig.2 Curve of reaction time

从图2可知,随着反应时间的增加,反应液的吸光度逐渐增大,当反应时间达到40min时,反应基本达到平衡,故实验选用反应时间为40min。

2.4 线性关系与检测限

将浓度为0.07、0.09、0.20、0.25、0.30、0.40、0.50、0.65、0.70、0.75mg/ml的标准牛IgG与抗体反应后,可求得不同浓度IgG的吸光度。经线性回归分析可得,标准牛IgG吸光值与浓度的线性回归方程为: $y=0.2691x+0.2001$ ($R^2=0.9955$)。IgG浓度在0.07~0.75mg/ml范围内线性关系良好。将标准牛IgG溶液浓度进一步继续降低或增加,则所得的IgG光密度值逐步偏离标准曲线。因此,此法测定IgG的最大检测限为750 μ g/ml,最小检测限为70 μ g/ml。

2.5 准确性实验

对三种初乳粉样品在完全相同的实验条件下,即在所用药品、反应条件、检测设备都相同的条件下进行重复5次测定,其IgG含量实验结果见表2。

表2 分析方法的准确性研究
Table 2 Accuracy of assay method

样品名称	分析次数(n)	IgG含量(mg/ml)	变异系数(%)
样品1	5	0.360 \pm 0.008	2.22
样品2	5	0.614 \pm 0.020	3.26
样品3	5	0.473 \pm 0.010	2.11
样品4	5	0.567 \pm 0.021	3.70

由表2分析结果可知,重复5次测定三个样品反应液中IgG含量准确性好,组内变异系数较小。

2.6 回收率

取3种不同浓度的牛初乳样品反应液,分别在3种浓度的反应液中再加入两种不同浓度的IgG标准液作为混合液。分别测定反应液、混合液、IgG标准液中IgG的含量并据此计算回收率,实验结果见表3。

由表3可知,免疫透射比浊检测方法测定IgG的回

表3 回收率的测定(n=6)
Table 3 Analysis of recovery (n=6)

序号	样品中 IgG 含量 (mg/ml)	加入标准 IgG 含量 (mg/ml)	IgG 实测值 (mg/ml)	回收率 (%)
1	0.354	0.100	0.456	100.44
2	0.211	0.100	0.329	105.78
3	0.178	0.100	0.283	101.80
4	0.354	0.200	0.555	100.18
5	0.211	0.200	0.419	101.95
6	0.178	0.200	0.402	106.35

收率为 100.18%~106.35%，相对标准偏差(RSD)为 2.67%。

2.7 与火箭免疫电泳法比较

对同一牛初乳产品采用免疫透射比浊法和火箭免疫电泳法测定其免疫球蛋白 IgG 含量，每组试验 3 个重复 (n=3)，用 T 检验对结果进行比较，结果见表 4。

表4 免疫透射比浊法与火箭免疫电泳法的 T 检验结果
Table 4 Result of T-test for immunoturbidimetric assay method or rocket immunoelectrophoretic method of IgG concentration

方法		n	Mean	t	d.f	Sig. (双尾)
IgG 含量	免疫透射比浊法	3	0.4590	0.8	4	0.469
(mg/ml)	火箭免疫电泳法	3	0.4563			

由表 4 的 T 检验结果可知，免疫透射比浊法和火箭免疫电泳法测定免疫球蛋白 IgG 含量差异不显著 (p > 0.05)，这更进一步说明免疫透射比浊法具有可靠性。

3 结 论

本研究所建立检测牛初乳 IgG 的免疫比浊法，具有检测时间短、操作简便、费用较低、对设备要求不高，准确性好的特点，是快速检测牛初乳及其制品中 IgG 含量的最佳方法。

参考文献：

[1] KORHONEN H, MARNILA P, GILL H S. Milk immunoglobulins and complement factors[J]. Br J Nutr, 2000, 84(Suppl10): 875-880.

[2] FRENYO V L. Studies on the absorption of homologous and heterologous IgG in artificially reared newborn pigs[J]. Veterinary Research Communications, 1987, 11(1): 23-30.

[3] SMITH E L. The immune proteins of bovine colostrum and plasma[J]. J Bio Chem, 1946, 164: 345-385.

[4] ECKERSALL P D, CONNER J G, HARVINE J. An immunoturbidimetric assay for canine C-reactive protein[J]. Veterinary Research Communications, 1991, 15(1): 17-24.

[5] 覃扬. 医学分子生物学实验教程[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004: 205-211.

[6] 赵娟. 免疫透射比浊法测定血清多种蛋白成分方法学研究[J]. 中国热带医学, 2003, 3(2): 203-205.

[7] 张和平, 郭军, 李立民, 等. 牛初乳中免疫球蛋白的测定[J]. 中国乳品工业, 2001, 29(2): 22-25.

[8] 李建武, 萧能庚, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 2001.