

# 主动免疫血管活性肠肽对 泰和鸡繁殖性能的影响

陈 峰 施振旦 毕英佐 曹永长

(华南农业大学动物科学系, 广州 510642)

**摘要** 56周龄的母泰和鸡分为3组。第1组( $n=35$ )用血管活性肠肽(VIP)类似物与牛血清白蛋白(BSA)的偶联物进行免疫, 第2组( $n=33$ )用矿油佐剂与水的乳化物进行注射, 第3组( $n=36$ )作空白对照。试验结果显示: 与对照组相比, 免疫组日抱窝率明显减少, 产蛋高峰后的产蛋率明显高于对照组, 且各组间蛋的受精率和孵化率无明显差异。第1、2组血浆VIP类似物抗体及催乳素(PRL)水平的酶联免疫吸附试验(ELISA)检测结果显示: 第1组二免后VIP类似物抗体水平最高, P/N达 $4.93\pm1.16$ , 而第2组的检测结果为阴性; 第1组免疫后的血浆PRL水平明显低于同期的第2组。以上结果表明, 在泰和鸡中主动免疫VIP可以降低血浆的PRL水平, 减少抱窝率, 提高产蛋率。

**关键词** 血管活性肠肽; 抱窝; 产蛋; 催乳素; 免疫; 泰和鸡

**中图分类号** S 381.1

母禽抱窝发生的机理, 主要来自于火鸡和矮脚鸡中的研究(EL Halawani et al, 1993)。一般认为, 由于体内雌激素的预先作用, 母禽对排卵前孕酮的分泌高峰作出反应, 使母禽于大约24 h后进巢产蛋, 这种进巢产蛋行为频率逐渐增强。同时, 体内PRL水平逐渐升高, 最后高水平的PRL使这种进巢产蛋行为固定为抱窝行为。

与抱窝有关的各种激素中, PRL是抱窝维持和发展的关键激素。而VIP是一种28肽, 在火鸡和矮脚鸡中已被证明是PRL的主要释放因子(Macnamee et al, 1986; Sharp, 1989)。因此, 若能抑制VIP分泌, 便能降低PRL的水平而达到抑制抱窝提高产蛋的目的。根据这一原理, Sharp等(1989)在就巢的矮脚鸡上用被动免疫的方法, 抑制了PRL的分泌, 提高了促黄体素(LH)的分泌并于处理5d后使鸡停止就巢。El Halawali等(1995)在火鸡上用主动免疫的方法, 成功地抑制了PRL的分泌, 降低了就巢率并大大地提高了产蛋量。

泰和鸡就巢性很强, 因而大大影响了其产蛋水平。本研究以VIP的C一末端15个氨基酸片段与BSA的偶联物作为抗原, 主动免疫VIP, 以研究对泰和鸡的血浆PRL、就巢性及产蛋性能等方面的影响, 旨在研制一种适用于大规模鸡场的抱窝抑制剂。

## 1 材料与方法

### 1.1 疫苗的制作

1.1.1 主要试剂及仪器 禽VIP(CVIP)类似物, 为CVIP的C一末端的15个氨基酸片段, 其氨基酸顺序为: RKQMAVKKYLNSVLT(美国生物合成公司); BSA(上海化学试剂采购供

应站); 25% 戊二醛; 磁力搅拌器; 紫外光扫描仪; 冻干机等。

1.1.2 偶联试验 (1) VIP 类似物与 BSA 的偶联: 参考朱平等(1994)的方法。称取 VIP 类似物 11 mg 和 BSA 30 mg, 溶于 5 mL 0.1 mol/L pH7.0 的 PBS 中, 放在磁力搅拌器上不停地搅拌, 然后缓慢加入 2.5 mL 0.2% 的戊二醛, 于室温中搅拌反应 2 h, 加 1 mol/L 的甘氨酸 1.25 mL, 继续搅拌反应 1 h, 再将反应物在 4℃ 条件下透析 48 h 后取出, 低温保存待用。

(2) 偶联效果鉴定: 用紫外光扫描偶联物吸收峰检测偶联效果。

1.1.3 疫苗的制作 将获得的偶联物与矿油佐剂乳化即制成油包水型疫苗。

## 1.2 试验动物的分组与处理

选用 56 周龄体重和体格基本一致的同一日龄抱窝的健康种母泰和鸡, 将转群后的醒抱鸡作为试验动物。试验鸡共分 3 组, 分组及处理见表 1 所示, 用 200 μg VIP 类似物所制成的抗原做成 1 mL 的疫苗。

表 1 试验动物的分组与处理

组别	鸡数	处理	免疫周龄	接种量/只·次 <sup>-1</sup>
1	35	抗原+矿油佐剂	56 60	第 1 次 0.5 mL, 第 2 次 1 mL
2	33	水+矿油佐剂	56 60	第 1 次 0.5 mL, 第 2 次 1 mL
3	36	空白对照		

第 1、2 组在 56、60、62、66 周龄时各采血 1 次, 分离血浆后低温保存下待测。

## 1.3 测试指标

1) 日抱窝率。2) 周产蛋率。3) 蛋的受精率和孵化率。4) 血浆中 PRL 含量: 用 ELISA 的竞争法测定, 参考 Lewis 等(1992)的方法, 结果用 ng/mL 表示。5) 血浆中 VIP 类似物抗体水平: 用 ELISA 的间接法测定, 参考戴华生等(1983)的方法, 结果用 P/N[ 样本的光密度(OD)值—非特异孔的 OD 值]/(标准阴性样本的 OD 值—非特异孔的 OD 值)] 来表示。

## 2 结果

### 2.1 免疫原的含量及紫外光谱的扫描测定

分别在偶联前后测干物质的重量, 得偶联物的含量为 540 μg/mL 疫苗。

BSA、VIP 类似物、VIP 类似物—BSA 紫外波谱扫描显示, BSA 在 278 nm 处出现吸收峰, VIP 类似物在 258 nm 处出现吸收峰, 而 VIP 类似物—BSA 在 265 nm 处出现吸收峰。VIP 类似物与 BSA 偶联后吸收峰发生变化, 表明偶联反应确有发生。

### 2.2 主动免疫 VIP 对泰和鸡抱窝的影响

由图 1 可知: 二免前, 各组的日抱窝率差异不大; 二免后, 第 1 组的日抱窝率基本维持 20% 左右的水平约 4 周, 然后继续上升; 而其他两组继续上升直至一定的水平。各组间日抱窝率作显著性检验后得到: 第 1 组有约 25 d 与其他两组差异显著( $P < 0.05$ ); 第 2 组与第 3 组之间差异不显著( $P > 0.05$ )。

### 2.3 主动免疫 VIP 对泰和鸡产蛋的影响

第一次处理后, 各组很快达到产蛋高峰, 但随着抱窝鸡的出现, 产蛋率开始下降。由图 2 可知: 第 1 组的产蛋率下降速度最慢, 并很快回升。将这几组间高峰后的周产蛋率作百分数检验后得到: 第 1 组高峰后有 3 周与其它两组差异极显著( $P < 0.01$ )。

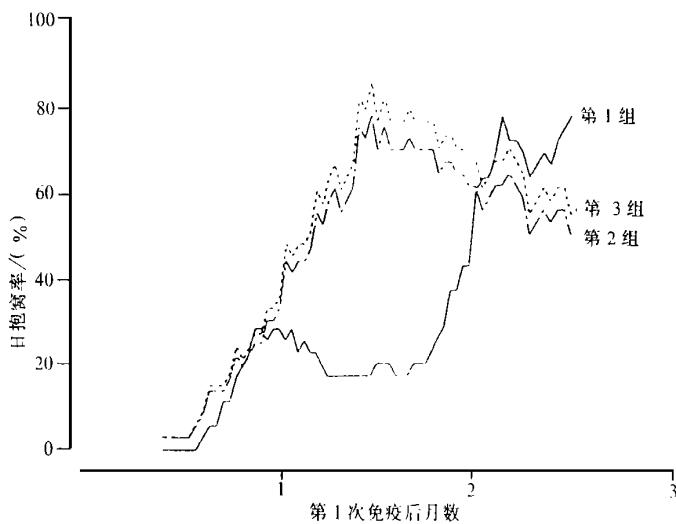


图 1 试验各组抱窝情况

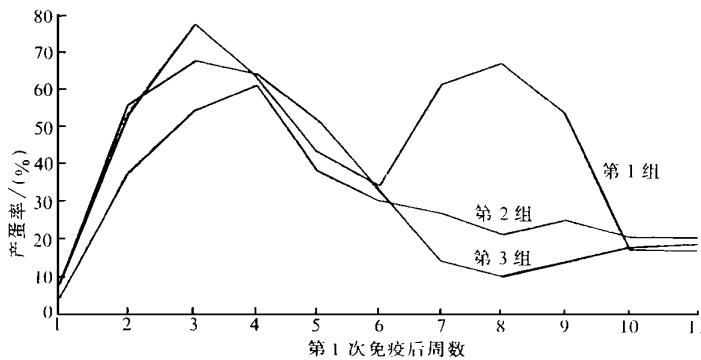


图 2 试验各组的产蛋情况

## 2.4 主动免疫 VIP 对泰和鸡蛋的受精率及孵化率的影响。

随机抽取试验过程中各组鸡所产的蛋, 检测受精率和孵化率, 结果如表 2 所示。从表上可以看出, 各组的受精率和孵化率差异不大 ( $P > 0.05$ )。

表 2 试验各组蛋的受精和孵化率情况

组别	蛋数/枚	光蛋数/枚	孵出小鸡数/只	受精率/ (%)	孵化率/ (%)
第 1 组	205	13	168	93.6585	81.9512
第 2 组	157	7	132	95.5414	84.0764
第 3 组	183	12	151	93.4426	82.5137

## 2.5 主动免疫 VIP 对泰和鸡血浆 PRL 水平的影响。

由表 3 可知, 第 1 组在第 1 次免疫之后, 其血浆的 PRL 水平明显低于第 2 组; 第 2 次免

疫之后, 第 1 组的血浆 PRL 水平继续下降, 然后又上升。将此两组在 60、62、66 周的血浆 PRL 水平作方差分析后得到: 60 周龄时, 两组 PRL 水平差异显著 ( $P < 0.05$ ); 62 周龄时, 两组的 PRL 水平差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 66 周龄时, 两组的 PRL 水平差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

表 3 第 1、2 组不同时期的 PRL 水平<sup>1)</sup>

采血时间	PRL 值/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	
	第 1 组	第 2 组
56 周		151. 8 $\pm$ 69. 0(13)
60 周	82. 7 $\pm$ 98. 0(13)	313. 6 $\pm$ 331. 5(13)
62 周	60. 8 $\pm$ 90. 5(13)	367. 5 $\pm$ 366. 2(14)
66 周	212. 8 $\pm$ 205. 8(14)	338. 1 $\pm$ 404. 6(13)

1) 括号内为检测样本数

## 2.6 主动免疫 VIP 产生 VIP 类似物抗体的情况

由表 4 可知: 第 1 组在第 1 次免疫后 4 周, 血浆抗体的 P/N 达  $3.25 \pm 2.35$ ; 第 2 次免疫后 2 周, 其 P/N 值最高, 达  $4.93 \pm 1.16$ ; 4 周后, 其 P/N 值为  $3.73 \pm 0.84$ 。而第 2 组的血浆及第 1 组第 1 次采血的血浆均检测不出 VIP 类似物的抗体。

表 4 第 1、2 组不同时期的抗体水平<sup>1)</sup>

采血时间	P/N 值	
	第 1 组	第 2 组
56 周		* (18)
60 周	3.25 $\pm$ 2.35 (13)	* (10)
62 周	4.93 $\pm$ 1.16 (13)	* (10)
66 周	3.73 $\pm$ 0.84 (14)	* (10)

1) 表中“\*”指此检测结果为阴性, 括号内为检测样本数

## 3 讨论与结论

自 Said 和 Mutt 于 1970 年从猪小肠的甲醇抽取液中分离纯化到 VIP 以来 (龚岳亭, 1985), 学者们对其进行了一系列的研究。VIP 被发现后, 最初被认为仅是一种胃肠道激素。Yamada 等(1982)和 Mikami 等(1984)在日本鹌鹑中用免疫组织化学的方法, Macnamee 等(1986)在矮脚鸡中用体内试验的方法, Macnamee 等(1986)在矮脚鸡及火鸡用体外试验的方法, Sharp 等(1989)在矮脚鸡上用被动免疫的方法, El Halawali 等(1995)在火鸡上用主动免疫的方法, 基本证明了在禽类中 VIP 是一个主要的 PRL 释放因子。

在火鸡和矮脚鸡中, PRL 是抱窝发生和维持的一个十分重要的激素 (Sharp et al, 1989; EL Halawali et al, 1993)。一般来说, 母禽就巢后 PRL 上升很快, 随后很快停止产蛋, 这主要是高水平的 PRL 对生殖系统的抑制造成, 高水平的 PRL 除直接抑制卵巢的发育外, 主要作用是抑制垂体促性腺激素的分泌 (Sharp et al, 1989)。因此, 如果能抑制 PRL 的分泌, 便能抑制抱窝, 提高产蛋量。

在本试验中, 我们用戊二醛的方法将 CVIP 的 C—末端的 15 个 AA 片段与 BSA 偶联后,

对泰和鸡进行免疫注射, 试图通过产生以中和下丘脑 VIP 的抗体来降低血液的 PRL 水平。结果在 PRL 的水平上, 试验组明显小于对照组; 在抱窝率上, 试验组明显减少; 在产蛋率上, 试验组增加, 且此免疫对蛋的受精率和孵化率无明显影响。此结果与 EL Halawani 等(1995)在火鸡上的结果相似, 但与他们的结果相比, 抱窝的数量减少有限, 并较早地出现了抱窝。这可能是本试验仅用 CVIP 的 15 个 AA, 偶联条件又未作进一步筛选, 以及免疫佐剂和免疫剂量方面存在的问题, 导致疫苗的免疫原性不够, 或者种属差异也对试验结果造成一定的影响。

根据以上结果, 可以得出如下结论: 在泰和鸡中用 VIP 类似物—BSA 作免疫原主动免疫 VIP 可降低血浆的 PRL 水平, 减少抱窝的发生, 提高鸡产蛋率, 并且对蛋的受精率和孵化率无影响。

#### 参 考 文 献

- 朱 平, 冯书章主编. 1994. 抗体实验技术. 长春: 长春出版社, 79~94
- 龚岳亭编著. 1985. 生物活性肽—结构与功能. 上海: 上海科技出版社, 188~192
- 戴生华, 王太江, 向近敏, 等主编. 1983. 新实验病毒学. 北京: 中国学术出版社, 414~456
- EL Halawani M E, Rozenboim I. 1993. The ontogeny and control of incubation behavior in turkeys. Poult Sci, 72: 906~911
- EL Halawani M E, Silsby J L, Rozenboim I, et al. 1995. Increased egg production by active immunization against vasoactive intestinal peptide in the turkey. Bio Rep, 52: 179~183
- Lewis J G, Elder P A, Barnell G K. 1992. An enzyme-immunosorbent assay (ELISA) for measuring prolactin levels in ovine and cervine plasma. New Zealand Journal of agricultural research, 35: 109~115
- Macnamee M C, Sharp P J, Lea R W, et al. 1986. Evidence that vasoactive intestinal peptide is a physiological prolactin-releasing factor in the bantam hen. Gen Comp Endocrinol, 62: 470~478
- Mikami S, Yamada S. 1984. Immunohistochemistry of the hypothalamic neuropeptides and anterior pituitary cells in the Japanese quail. J EXP Zool, 232: 405~417
- Sharp P J. 1989. Physiology of egg production. In Nixey C, Grey TC ed, Recent advance in Turkey science. London: Butterworths, 31~54
- Sharp P J, Sterling R J, Talbot R T, et al. 1989. The role of hypothalamic vasoactive intestinal polypeptide in the maintenance of prolactin secretion in incubating bantam hens: observation using passive immunization, radioimmunoassay and immunohistochemistry. J Endocrinol, 122: 5~13
- Yamada S, Mikami S. 1982. Immunohistochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-containing neurons in the hypothalamus of the Japanese quail. Cell Tissue Res, 226: 13~26

# EFFECT OF ACTIVE IMMUNIZATION AGAINST VASOACTIVE INTESTINE PEPTIDE ON THE REPRODUCTIVE PERFORMANCE IN TAIHE HENS

Chen Feng      Shi Zhendan      Bi Yingzuo      Cao Yongchang

(Dept. of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642)

## Abstract

Fifty-six-week-old Taihe hens were divided into three groups. Group 1 hens ( $n=35$ ) were immunized with the conjugate of C-terminating fragment of vasoactive intestinal peptide (VIP) and bovine serum albumin (BSA). Group 2 hens ( $n=33$ ) were injected with the mixture of mineral oil adjuvant and water; Group 3 hens ( $n=36$ ) served as nontreated controls. The results showed that, in contrast with the controls, daily broody rates of the immunized group decreased greatly, while the rates of egg production were higher than that of the control after the peak of egg production. Fertilizing rates and incubating rates of eggs had no remarkable difference among groups. Antibody to the fragment of VIP and prolactin in plasma of group 1 and 2 were detected with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The antibody in group 1 reached peak value ( $P/N$  was  $4.93 \pm 1.16$ ) two weeks after the second immunization, but it wasn't detected in group 2. After immunization, the prolactin level in group 1 was much lower than that in group 2. These results demonstrated that active immunization against VIP decreased plasma prolactin and broody rate, increased egg production.

**Key words** VIP; broodiness; egg production; prolactin; immunization; TaiHe hens