



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101857892 A

(43) 申请公布日 2010.10.13

(21) 申请号 201010160215.1

(22) 申请日 2010.04.29

(71) 申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路 88 号

(72) 发明人 陈国宏 刘艳 胡国顺 栾德琴

龚琳琳 陈蓉 李碧春 王伟

侯庆文

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 卢亚丽

(51) Int. Cl.

*C12Q 1/06* (2006.01)

*G01N 15/10* (2006.01)

*G01N 33/50* (2006.01)

*G01N 33/53* (2006.01)

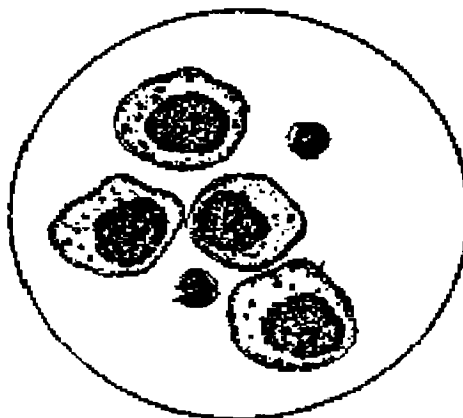
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种肉鸡抗性评价的新方法

(57) 摘要

本发明涉及一种肉鸡抗性评价的方法,该方法是从 0 周龄到 12 周龄期间在每隔两周龄的 7 个生长阶段测定淋巴细胞转化率;单抗标记的 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、T 细胞数量,CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> 的比例;IgG 和 IgM;免疫细胞指数:胸腺、脾脏、法氏囊的绝对重量与鸡体重量;血液指标:每毫升血液里红细胞,白细胞总数、T 细胞、B 细胞总数;细胞因子指标:干扰素;然后将上述 6 个指标进行综合评价,以综合评分作为判定样本抗性程度的依据。本发明与现有技术相比,对肉鸡的抗性评价具有全面、准确的优点,有广阔的应用前景。



1. 一种肉鸡抗性评价的方法,其特征在于,是从0周龄到12周龄期间在每隔两周龄的7个生长阶段测定以下指标:

- (1) 淋巴细胞转化率;
- (2) 单抗标记的 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、T细胞数量, $CD4^+$  :  $CD8^+$ 的比例;
- (3) IgG和IgM;
- (4) 免疫细胞指数:胸腺、脾脏、法氏囊的绝对重量与鸡体重量;
- (5) 血液指标:每毫升血液里红细胞,白细胞总数、T细胞、B细胞总数;
- (6) 细胞因子指标:干扰素;

然后将上述6个指标进行综合评价,以综合评分作为判定样本抗性程度的依据。

## 一种肉鸡抗性评价的新方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及分子遗传学、免疫学和细胞生物学领域,具体涉及一种肉鸡抗性评价的方法。

### 背景技术

[0002] 家禽各种疾病的发生是难以避免的,而且逐年呈上升趋势。现已有不少肉鸡抗性评价的方法,但都没有规范化、标准化,难以达成一致。最重要的是单一的指标不能全面的说明问题,况且不同人在不同时间在不同地点对不同群体用不同方法测定的一些抗性指标也难以比较,难以参考,从而很难下定结论,进一步影响了遗传育种工作的开展以及养禽业的发展。国内对规范肉鸡抗性指标测定操作流程方面的研究还未见有报道。现有的方法只是片面的、就单个抗病指标加以分析,缺乏全面性,我们通过查阅大量资料并加以一些相关的常规实验的验证,选取了 6 项主要的抗病指标,互补其长短,以期达到全面、准确的目的。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种肉鸡抗性评价的新方法。

[0004] 本发明的技术方案是:在选定的如皋鸡群体的 0 周龄到 12 周龄期间每隔两周龄的 7 个生长阶段中用尽可能常规的仪器分别测定所选定的 6 个主要的抗性指标,分别为:

[0005] (1) 淋巴细胞转化率;

[0006] (2) 单抗标记的  $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、T 细胞数量,  $CD4^+$  :  $CD8^+$  的比例;

[0007] (3) IgG 和 IgM;

[0008] (4) 免疫细胞指数:胸腺、脾脏、法氏囊的绝对重量与鸡体重量;

[0009] (5) 血液指标:每毫升血液里红细胞,白细胞总数、T 细胞、B 细胞总数;

[0010] (6) 细胞因子指标:干扰素;

[0011] 然后将上述 6 个指标进行综合评价,以综合评分作为判定样本抗性程度的依据。

[0012] 我们使用尽可能常规的仪器和尽可能简便的方法,将现有的技术简化,尽可能做到简单易行且准确。根据我们的实验结果,对同群体,使用单一的或其中几个抗性指标进行评价时,会忽略一些对抗性有影响的因素的作用,从而得到的结果欠准确,而使用本发明的方法来进行抗性评价,会得到较单一或几个指标评价更加全面、准确的结果(具体数据说明见下表)。

[0013] 本发明与现有技术相比,对肉鸡的抗性评价具有全面、准确的优点,有广阔的应用前景。我们对群体中的每个个体进行打分,汇总后得到一个平均分,来评价该群体。分数为 10-7(包括 7) 时,说明具有高抗性;为 7-4(包括 4) 时,说明具有中度抗性;在 4 以下时,说明具有低抗性。

### 附图说明

[0014] 图 1:T 淋巴细胞的转化

[0015] 图 2 :CD4PE-A

[0016] 图 3 :红细胞

[0017] 图 4 :白细胞

### 具体实施方式

[0018] 实施例 1 本发明选取的 6 个抗性指标的具体的测定方法：

[0019] 1、淋巴细胞转化率的测定

[0020] 取无菌肝素抗凝血 0.1ml,加入 1.8ml 细胞培养液(用前调至含小牛血清 10%、青霉素 100u/ml、链霉素  $\mu$  g/ml,用 NaHCO<sub>3</sub> 调 pH 至 7.2-7.4)中,同时加入 PHA(用 RPMI1 640 基础培养液配成 1000  $\mu$  g/ml)0.1ml,对照管不加 PHA,将细胞置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 3 天,每天摇动 1 次。2500r/min,离心 10min 后弃上清液,留 0.2ml 沉淀细胞制片,迅速吹干。吉姆萨染色 10-20min,水洗,干燥。由于大的细胞离心后居上层者较多,只吸上层细胞推片计数,结果易偏高。所以准确计数方法是在倒净上清后,残留与管壁的少量液体回流至管底后,用毛细滴管吹打将管内细胞打散,置 1 滴于玻片上,用毛细滴管前端刮片,均匀分布于全片,染色,按头、体、尾三段各 1~2 纵列(计数走向似城墙形)进行计数,以减少分布不均带来的误差,每片计数 100~200 个淋巴细胞。记录转化和未转化的淋巴细胞数,求出转化率。

[0021] 表 1-1 :应用此方法测定的如皋鸡 8 周龄的淋巴细胞转化率

[0022]

编号	1	2	3	4	5	6	7
淋巴细胞转化率 (%)	8.91	6.18	14.05	5.76	3.69	11.51	8.89

[0023] 淋巴母细胞的形态学标准是细胞核的大小、核与胞浆的比例、胞浆染色性及核的构造与核仁的有无。可以见到以下几种类型细胞(见图 1)：

[0024] (1) 成熟的小淋巴细胞 :与未经培养的小淋巴细胞一样为 6-8  $\mu$  m,核染色致密,无核仁,核与胞浆比例大,胞浆染色为轻度嗜碱性。

[0025] (2) 过渡型淋巴细胞 :比小淋巴细胞大,约 10-20  $\mu$  m,核染色致密,但出现核仁,此为与成熟小淋巴细胞鉴别要点。

[0026] (3) 淋巴母细胞 :细胞体积增大,约 20-30  $\mu$  m,形态不整齐,常有小突出,核质染色疏松,有核仁 1-2 个,胞浆变宽,常出现胞浆空泡。

[0027] (4) 其它细胞 :如中性粒细胞在培养 72h 后,绝大部分衰变或死亡,呈碎片。

[0028] 表 1-2 :淋巴细胞转化率指标评分

[0029]

淋巴细胞转换率 (%)	4-8	8-10	4 以下	10 以上
样本数量	12	6	7	7
评分	10	7	4	1
总分	120	42	28	7
平均评分：6.16，说明具有中度抗性				

[0030] 2、用流式细胞仪检测单抗标记的 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup> (CD<sub>4</sub><sup>+</sup> 为 T4 细胞在每微升血液中的含量, CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 为 T8 细胞在每微升血液中的含量) 数量, CD<sub>4</sub><sup>+</sup> : CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 的比例 ;T 细胞总数

[0031] 流式细胞法 :首先是淋巴细胞的分离 :取 4ml 肝素钠抗凝的鸡外周血液,用等体积的 0.9% 的生理盐水稀释血液。或取肝脏细胞,加 PBS 研磨,过滤 ;1600rpm/min,离心 8 分钟 ;弃上清,加 PBS 将沉淀重悬。吸取 6ml 稀释的样品,沿管壁缓慢铺到淋巴细胞分离液上,勿打乱液层界面。2000rpm/min 水平离心 20min。离后血浆层与分离液之间有一层较密的白膜,吸入白膜放入另一试管。加 10ml 生理盐水稀释分离的淋巴细胞,加 PBS 重复洗涤 2-3 次。最后用 1% 的胎牛血清调整细胞浓度,达到 10<sup>6</sup> 细胞,备用。其次是 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 的测定 :每个样品加入 10 μ l 染色液 (鼠抗鸡的 CD<sub>4</sub>, CD<sub>8</sub><sup>+</sup>),混匀,4℃ 避光 30min。之后 2000rpm/min,5 分钟。弃上清加 1% 胎牛血清 1ml,离心 4min。弃上清,用 PBS 重复洗涤 2-3 次,加 100 ~ 200ml PBS 混匀,即可。放入 BD Biosciences 的流式细胞分选仪, FACS Aria II 进样处,测定,以得到相应的数据和图片 (见图 2)。

[0032] 表 2-1 :应用此方法测定的部分如皋鸡 8 周龄的 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> : CD<sub>8</sub><sup>+</sup>

[0033]

编号	1	2	3	4	5	6	7
CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> : CD <sub>8</sub> <sup>+</sup>	0.4933	0.4789	0.4806	0.4649	0.2117	0.5760	0.9553

[0034] 表 2-2 :CD<sub>4</sub><sup>+</sup> : CD<sub>8</sub><sup>+</sup> 指标评分

[0035]

CD <sub>4</sub> <sup>+</sup> : CD <sub>8</sub> <sup>+</sup>	0.4-0.8	0.8-1.0	0.4 以下	1.0 以上
样本数量	16	4	15	6
评分	10	7	4	1
总分	160	28	60	6
平均评分: 6.20, 说明具有中度抗性				

[0036] 3、体液免疫水平 :ELISA 检测 IgG 和 IgM (正常和抗病)

[0037] 用美国加利福尼亚 RapidBio 实验室制备的 ELISA 试剂盒处理样本,用上海智城分析仪器制造有限公司的 MPF-400 型荧光 / 化学发光酶标仪测定,读取数据。

[0038] 表 3-1 :应用此方法测定的部分如皋鸡 8 周龄的 IgG

[0039]

编号	1	2	3	4	5	6	7
IgG	0.311	0.237	0.313	0.379	0.27	0.291	0.381

[0040] 表 3-2 :IgG 指标评分

[0041]

IgG	120-170	170-200	120 以下	200 以上
样本数量	16	4	15	6
评分	10	7	4	1
总分	160	28	60	6
平均评分：7.00，说明具有中度抗性				

[0042] 4、免疫细胞指数：胸腺、脾脏、法氏囊的绝对重量与鸡体重量

[0043] 先称取经高压灭菌的指形管的重量，计为  $w_1$ ，再将采取的胸腺、脾脏、法氏囊对应装入称量好的指形管中，再次称取重量，计为  $w_2$ ；胸腺、脾脏、法氏囊的绝对重量等于相应的  $w_1-w_2$ ；鸡体重量可直接称取。

[0044] 表 4-1：应用此方法测定的部分如皋鸡 8 周龄的免疫细胞指数

[0045]

编号	1	2	3	4	5	6	7
胸腺 (g)	1.736	2.159	1.707	2.537	1.422	2.338	3.251
脾脏 (g)	0.633	0.782	1.277	0.905	0.68	1.08	1.535
法氏囊 (g)	0.447	0.876	0.494	1.038	0.54	0.402	1.148
鸡体重 (g)	535	550	550	635	665	545	575

[0046] 表 4-2：免疫细胞指数指标评分

[0047]

鸡体重 (g)	500-600	600-650	500 以下	650 以上
样本数量	24	7	7	6
评分	10	7	4	1
总分	240	49	28	6
平均评分：7.34，说明具有高抗性				

[0048] 5、血液指标：每毫升血液里红细胞，白细胞总数、T 细胞、B 细胞总数

[0049] 镜检细胞计数、红细胞分析仪。红细胞计数血液一般检查包括血红蛋白测定、红细胞计数、白细胞计数及其分类；白细胞分类计数，在显微镜下按白细胞形态特征计算出各种白细胞的百分比。目前已具备全自动细胞分析仪，可进行自动细胞分类计数，但通常与显微镜检查并用（见图 3 和 4）。白细胞分类能反映白细胞在质量方面的变化。T 细胞、B 细胞总数在上述指标 2 中用流式细胞仪即可得到。

[0050] 表 5-1：应用此方法测定的部分如皋鸡 8 周龄的血液指标

[0051]

编号	1	2	3	4	5	6	7
红细胞比例 (%)	15.6	41.3	15.2	19.0	15.0	42.5	19.3

[0052] 表 5-2 :血液指标评分

[0053]

红细胞比例 (%)	15-30	15 以下	30-40	40 以上
样本数量	17	11	8	4
评分	10	7	4	1
总分	170	77	32	4
平均评分: 7.075, 说明具有高抗性				

[0054] 6、细胞因子指标:干扰素

[0055] 96 孔培养板中加入不同稀释度的 IFN 和标准 IFN, 每个稀释度设 3 孔, 每孔 50  $\mu$  l, 病毒对照不加 IFN。每孔加入 100  $\mu$  l  $1.5 \sim 2 \times 10^5$ /ml Wish 或 Hep-2 细胞悬液, 37 $^{\circ}$ C、CO<sub>2</sub> 孵箱培养 6 ~ 12h, 使细胞贴壁为单层。每孔加入 50  $\mu$  l 含 100 个 TCID<sub>50</sub> VSV, 细胞对照不加病毒液。根据细胞病变状态, 终止培养前 3 ~ 4h 加入 5mg/ml MTT, 15  $\mu$  L/ 孔。加入适量生理盐水, 用滴管轻轻吹吸弃去悬浮病变细胞和死细胞。200  $\mu$  l/ 孔二甲亚砷 (DMSO), 作用 10min。测 OD(570nm), 表示活细胞中含干扰素的量。也可用刚果红摄入法、结晶紫染色法测定 IFN 对活细胞的保护水平。计算: 以保护半数 (50%) 细胞免受病毒损害的最高干扰素稀释度为 1 个干扰素活性单位。也可从标准曲线中求得待测样品的 IFN 活性单位。

[0056] 表 6-1 :应用此方法测定的部分如皋鸡 8 周龄的干扰素

[0057]

编号	1	2	3	4	5	6	7
干扰素 (pg/ml)	1.255	1.105	1.199	0.980	1.334	1.274	1.206

[0058] 表 6-2 :干扰素指标评分

[0059]

干扰素 (pg/ml)	0.8-1.1	1.1-1.3	0.8 以下	1.3 以上
样本数量	18	14	3	8
评分	10	7	4	1
总分	180	98	12	8
平均评分: 6.88, 说明具有中度抗性				

[0060] 表 7 :六项指标综合评分

[0061]

抗性指标	淋巴细胞转化率 (%)	CD4 <sup>+</sup> : CD8 <sup>+</sup>	IgG	鸡体重 (g)	红细胞比例 (%)	干扰素 (pg/ml)	整体均分
评分	6.16	6.20	7.00	7.34	7.075	6.88	6.78

[0062] 从表 7 中可以看出, 当用本方法的 6 个指标综合评价时, 整体评分为 6.78, 说明该群体是具有中度抗性的。但是, 当用 IgG、鸡体重和红细胞比例单个指标评价其抗性时 (见

表 3-2、4-2、5-2), 就会出现一些偏差。难以得到准确的结果, 继而对之后开展的工作会带来误差。

[0063] 所以, 本发明规定了测定 6 个主要抗性指标的操作规程以及评价方法。用本方法中的 6 个主要的抗性指标评价肉鸡的抗性, 能够得到较准确可靠的实验数据, 为进一步工作的开展提供准确、可靠的依据。

[0064] 本研究还将如皋鸡的一些测定指标和隐性白羽鸡的一些测定指标做了比较, 以其说明本发明的实用性和准确性。

[0065] 以下为应用此方法测定的隐性白羽鸡的部分指标:

[0066] 表 8-1: 应用此方法测定的隐性白羽鸡淋巴细胞转化率

[0067] 编号	1	2	3	4	5	6
[0068] 淋巴细胞转						
[0069] 换率 (%)	4.43	5.59	13.03	14.06	9.52	23.39

[0071] 表 8-2: 隐性白羽鸡淋巴细胞转化率指标评分

[0072]

淋巴细胞转换率(%)	4-8	8-10	4 以下	10 以上
样本数量	5	2	4	25
评分	10	7	4	1
总分	50	14	16	25
平均评分: 2.92, 说明具有低抗性				

[0073] 表 8-1: 应用此方法测定的隐性白羽鸡  $CD_4^+ : CD_8^+$

[0074] 编号	1	2	3	4	5	6
[0075] $CD_4^+ : CD_8^+$	0.0535	0.1408	0.2263	0.2008	0.1699	0.2700

[0076] 表 8-2:  $CD_4^+ : CD_8^+$  指标评分

[0077]

$CD_4^+ : CD_8^+$	0.4-0.8	0.8-1.0	0.4 以下	1.0 以上
样本数量	1	0	22	0
评分	10	7	4	1
总分	10	0	76	0
平均评分: 4.26, 说明具有中度抗性				

[0078] 表 9-1: 应用此方法测定的隐性白羽鸡的 IgG

[0079] 编号	1	2	3	4	5	6
[0080] IgG	126	132	205	144	128	175

[0081] 表 9-2: IgG 指标评分

[0082]

IgG	120-170	170-200	120 以下	200 以上
样本数量	10	2	2	9
评分	10	7	4	1
总分	100	14	8	9
平均评分：5.70，说明具有中度抗性				

[0083] 表 10-1 :应用此方法测定的隐性白羽鸡红细胞比例

[0084] 编号	1	2	3	4	5	6
[0085] 红细胞比						
[0086]	27.6	16.7	38.2	31.2	17.2	33.4
[0087] 例 (%)						

[0088] 表 10-2 :红细胞比例指标评分

[0089]

红细胞比例 (%)	15-30	15 以下	30-40	40 以上
样本数量	3	5	3	11
评分	10	7	4	1
总分	30	35	12	11
平均评分：4.00，说明具有中度抗性				

[0090] 表 11 :隐性白羽鸡各指标综合评分

[0091]

抗性指标	淋巴细胞 转化率 (%)	CD4 <sup>+</sup> : CD8 <sup>+</sup>	IgG	红细胞比 例 (%)	整体均分
评分	2.92	4.26	5.70	4.00	4.22

[0092] 如皋鸡,是我国地方良种鸡之一,原产于江苏省如皋、如东及泰兴、姜堰等县(市),因其黄羽、黄皮肤、黄脚,当地也简称为“三黄鸡”,属蛋肉兼用型品种,抗病力强。隐性白羽鸡主要是从白洛克鸡选育形成的,生长速度远远高于我国地方鸡种的生长速度,但是在抗病力方面差于如皋鸡。我们对如皋鸡的和隐性白羽鸡两个群体测定了本发明中的一些抗性指标并将其做了比较(见表 1-1 至 11),以其说明本发明的实用性和准确性。比较结果显示:如皋鸡群体总体评分为 6.78,隐性白羽鸡群体总体评分为 4.22(见表 7 和 11)。虽然用本发明中的评分标准来衡量两个群体均为中度抗性,但在中度抗性范围内比较,评分结果如皋鸡的 6.78 远大于隐性白羽鸡的 4.22,结果显示如皋鸡的抗性大于隐性白羽鸡,这与事实相符,证实了本发明的准确性和可靠性。

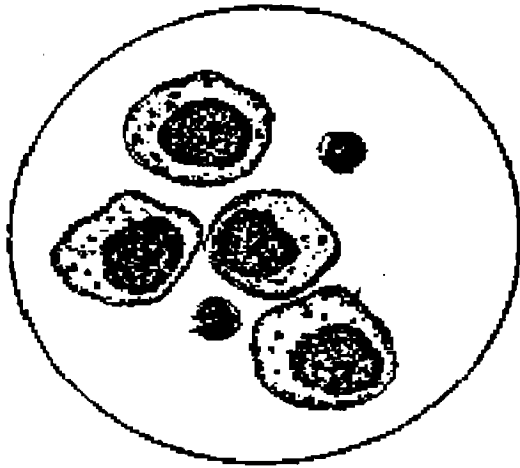


图 1

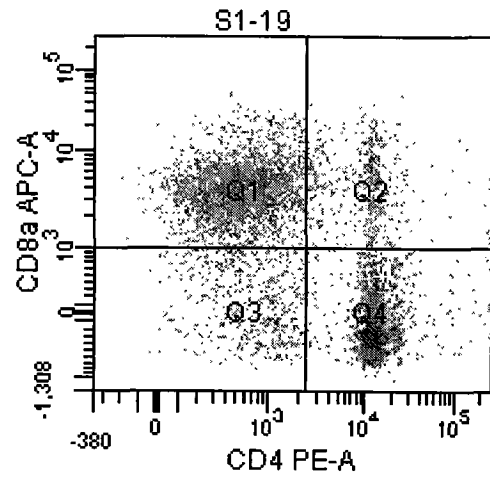


图 2

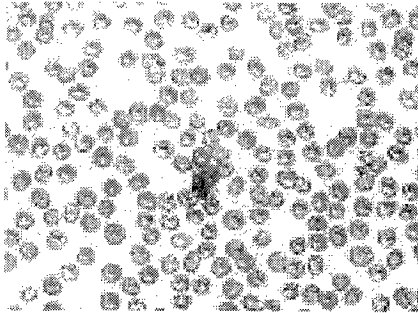


图 3

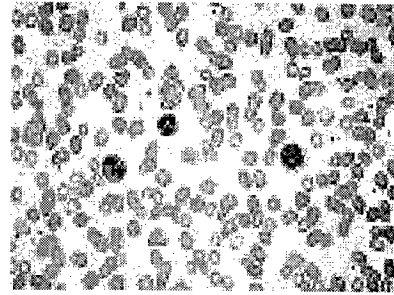


图 4

专利名称(译)	一种肉鸡抗性评价的新方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101857892A</a>	公开(公告)日	2010-10-13
申请号	CN201010160215.1	申请日	2010-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	扬州大学		
申请(专利权)人(译)	扬州大学		
当前申请(专利权)人(译)	扬州大学		
[标]发明人	陈国宏 刘艳 胡国顺 栾德琴 龚琳琳 陈蓉 李碧春 王伟 侯庆文		
发明人	陈国宏 刘艳 胡国顺 栾德琴 龚琳琳 陈蓉 李碧春 王伟 侯庆文		
IPC分类号	C12Q1/06 G01N15/10 G01N33/50 G01N33/53		
代理人(译)	卢亚丽		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种肉鸡抗性评价的方法，该方法是从0周龄到12周龄期间在每隔两周龄的7个生长阶段测定淋巴细胞转化率；单抗标记的CD4+、CD8+、T细胞数量，CD4+:CD8+的比例；IgG和IgM；免疫细胞指数：胸腺、脾脏、法氏囊的绝对重量与鸡体重量；血液指标：每毫升血液里红细胞，白细胞总数、T细胞、B细胞总数；细胞因子指标：干扰素；然后将上述6个指标进行综合评价，以综合评分作为判定样本抗性程度的依据。本发明与现有技术相比，对肉鸡的抗性评价具有全面、准确的优点，有广阔的应用前景。

