

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03819134.2

[43] 公开日 2006 年 1 月 4 日

[11] 公开号 CN 1717586A

[22] 申请日 2003.6.20 [21] 申请号 03819134.2
[30] 优先权

[32] 2002.6.21 [33] US [31] 60/390,725

[86] 国际申请 PCT/US2003/019581 2003.6.20

[87] 国际公布 WO2004/000009 英 2003.12.31

[85] 进入国家阶段日期 2005.2.7

[71] 申请人 猪改良英国有限公司

地址 英国牛津郡

[72] 发明人 卢西纳·克琳娜-潘托哈

约翰·巴斯蒂安森

马莎·A·梅林坎普

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 林晓红

权利要求书 9 页 说明书 28 页

[54] 发明名称

用于选择有效动物生长的方法

[57] 摘要

本发明一般性涉及动物育种方法。更特别地，
本发明涉及基于动物中免疫细胞亚型的数量及淋巴
细胞的增殖性应答的频率而在两个或多个动物之中
选择健壮性的方法。

1. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；确定每个动物中 CD16 抗原表达细胞的数量；及选择 CD16 抗原表达细胞数量最低的动物，从而在两或多个动物之中选择健壮性。

2. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；确定每个动物中 CD16 和 CD2 双阳性抗原表达细胞的数量；及选择 CD16 和 CD2 双阳性抗原表达细胞数量最低的动物，从而在两或多个动物之中选择健壮性。

3. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；确定每个动物中 CD8 抗原表达细胞的数量；及选择 CD8 抗原表达细胞数量最低的动物，从而在两或多个动物之中选择健壮性。

4. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；确定每个动物中 MHC-DQ 抗原表达细胞的数量；及选择 MHC-DQ 抗原表达细胞数量最高的动物，从而在两或多个动物之中选择健壮性。

5. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；确定每个动物中表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQB 抗原的细胞的数量；及选择表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQB 抗原的细胞数量最高的动物，从而在两或多个动物之中选择健壮性。

6. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；确定每个动物中表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQD 抗原的细胞的数量；及选择表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQD 抗原的细胞数量最高的动物，从而在两或多个动物之中选择健壮性。

7. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法, 所述方法包括如下步骤: 提供相同物种的两或多个动物; 确定每个动物中 CD4 抗原表达细胞的增殖频率; 及选择 CD4 抗原表达细胞增殖频率最低的动物, 从而在两或多个动物之中选择健壮性。

8. 权利要求 1 的方法, 其中所述物种选自: *Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

9. 权利要求 2 的方法, 其中所述物种选自: *Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

10. 权利要求 3 的方法, 其中所述物种选自: *Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

11. 权利要求 4 的方法, 其中所述物种选自: *Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

12. 权利要求 5 的方法, 其中所述物种选自: *Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

13. 权利要求 6 的方法, 其中所述物种选自: *Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

14. 权利要求 7 的方法, 其中所述物种选自: *Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

15. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法, 所述方法包括如下步骤: 提供相同物种的两或多个动物; 确定每个动物中 CD16 抗

原表达细胞、CD16 和 CD2 双阳性抗原表达细胞、CD8 抗原表达细胞、MHC-DQ 抗原表达细胞、表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQB 抗原的细胞及由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQD 抗原的细胞的数量；确定每个动物中 CD4 抗原表达细胞的增殖频率；及选择 CD16 抗原表达细胞数量最低、CD16 和 CD2 双阳性抗原表达细胞数量最低、CD8 抗原表达细胞数量最低、MHC-DQ 抗原表达细胞数量最高、表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQB 抗原的细胞数量最高、由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQD 抗原的细胞数量最高及 CD4 抗原表达细胞的增殖频率最低的动物，从而在两或多个动物之中选择健壮性。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babulus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

17. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；确定每个动物中 CD16 抗原表达细胞的数量；确定动物的 CD16 抗原表达细胞的数量与健壮性之间的统计学显著关联；及基于所述关联选择动物以改良健壮性。

18. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；确定每个动物中 CD16 和 CD2 双阳性抗原表达细胞的数量；确定动物的 CD16 和 CD2 双阳性抗原表达细胞的数量与健壮性之间的统计学显著关联；及基于所述关联选择动物以改良健壮性。

19. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；确定每个动物中 CD8 抗原表达细胞的数量；确定动物的 CD8 抗原表达细胞的数量与健壮性之间的统计学显著关联；及基于所述关联选择动物以改良健壮性。

20. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括

如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；确定每个动物中 MHC-DQ 抗原表达细胞的数量；确定动物的 MHC-DQ 抗原表达细胞的数量与健壮性之间的统计学显著关联；及基于所述关联选择动物以改良健壮性。

21. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；确定每个动物中表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQB 抗原的细胞的数量；确定动物的表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQB 抗原的细胞数量与健壮性之间的统计学显著关联；及基于所述关联选择动物以改良健壮性。

22. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；确定每个动物中表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQD 抗原的细胞数量；确定动物的表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQD 抗原的细胞数量与健壮性之间的统计学显著关联；及基于所述关联选择动物以改良健壮性。

23. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；确定每个动物中 CD4 抗原表达细胞的增殖频率；确定动物的 CD4 抗原表达细胞的增殖频率与健壮性之间的统计学显著关联；及基于所述关联选择动物以改良健壮性。

24. 权利要求 17 的方法，其中所述物种选自 *Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

25. 权利要求 18 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

26. 权利要求 19 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、

Meleagrus gallopavo、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

27. 权利要求 20 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

28. 权利要求 21 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

29. 权利要求 22 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

30. 权利要求 23 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

31. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；从动物中获得生物学样品，其中所述样品包含全血；确定每个动物中 CD16 抗原表达细胞的数量；及选择 CD16 抗原表达细胞数量最低的动物，从而在两或多个动物之中选择健壮性。

32. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；从动物中获得生物学样品，其中所述样品包含全血；确定每个动物中 CD16 和 CD2 双阳性抗原表达细胞的数量；及选择 CD16 和 CD2 双阳性抗原表达细胞数量最低的动物，从而在两或多个动物之中选择健壮性。

33. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；从动物中获得生物学样品，其中所述样品包含全血；确定每个动物中 CD8 抗原表达细胞的数量；及选择 CD8 抗原表达细胞数量最低的动物，从而在两或多个动物之

中选择健壮性。

34. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；从动物中获得生物学样品，其中所述样品包含全血；确定每个动物中 MHC-DQ 抗原表达细胞的数量；及选择 MHC-DQ 抗原表达细胞数量最高的动物，从而在两或多个动物之中选择健壮性。

35. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；从动物中获得生物学样品，其中所述样品包含全血；确定每个动物中表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQB 抗原的细胞的数量；及选择表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQB 抗原的细胞数量最高的动物，从而在两或多个动物之中选择健壮性。

36. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；从动物中获得生物学样品，其中所述样品包含全血；确定每个动物中表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQD 抗原的细胞的数量；及选择表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQD 抗原的细胞数量最高的动物，从而在两或多个动物之中选择健壮性。

37. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；从动物中获得生物学样品，其中所述样品包含全血；确定每个动物中 CD4 抗原表达细胞的增殖频率；及选择 CD4 抗原表达细胞增殖频率最低的动物，从而在两或多个动物之中选择健壮性。

38. 权利要求 31 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

39. 权利要求 32 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus*

scrofa、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

40. 权利要求 33 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

41. 权利要求 34 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

42. 权利要求 35 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

43. 权利要求 36 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

44. 权利要求 37 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

45. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；从动物中获得生物学样品，其中所述样品包含全血；确定每个动物中 CD16 抗原表达细胞的数量；确定动物的 CD16 抗原表达细胞的数量与健壮性之间的统计学显著关联；及基于所述关联选择动物以改良健壮性。

46. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；从动物中获得生物学样品，其中所述样品包含全血；确定每个动物中 CD16 和 CD2 双阳性抗原表达细胞的数量；确定动物的 CD16 和 CD2 双阳性抗原表达细胞的数量与健壮性之间的统计学显著关联；及基于所述关联选择动物以改

良健壮性。

47. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；从动物中获得生物学样品，其中所述样品包含全血；确定每个动物中 CD8 抗原表达细胞的数量；确定动物的 CD8 抗原表达细胞的数量与健壮性之间的统计学显著关联；及基于所述关联选择动物以改良健壮性。

48. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；从动物中获得生物学样品，其中所述样品包含全血；确定每个动物中 MHC-DQ 抗原表达细胞的数量；确定动物的 MHC-DQ 抗原表达细胞的数量与健壮性之间的统计学显著关联；及基于所述关联选择动物以改良健壮性。

49. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；从动物中获得生物学样品，其中所述样品包含全血；确定每个动物中表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQB 抗原的细胞的数量；确定动物的表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQB 抗原的细胞的数量与健壮性之间的统计学显著关联；及基于所述关联选择动物以改良健壮性。

50. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；从动物中获得生物学样品，其中所述样品包含全血；确定每个动物中表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQD 抗原的细胞的数量；确定动物的表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQD 抗原的细胞的数量与健壮性之间的统计学显著关联；及基于所述关联选择动物以改良健壮性。

51. 一种在两或多个动物之中选择健壮性的方法，所述方法包括如下步骤：提供相同物种的两或多个动物；从动物中获得生物学样品，其中所述样品包含全血；确定每个动物中 CD4 抗原表达细胞的增殖频率；确定动物的 CD4 抗原表达细胞的增殖频率与健壮性之间的统

计学显著关联；及基于所述关联选择动物以改良健壮性。

52. 权利要求 45 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

53. 权利要求 46 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

54. 权利要求 47 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

55. 权利要求 48 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

56. 权利要求 49 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

57. 权利要求 50 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

58. 权利要求 51 的方法，其中所述物种选自：*Bos taurus*、*Sus scrofa*、*Ovis aries*、*Bison bison*、*Babalus babalus*、*Gallus domesticus*、*Meleagrus gallopavo*、*Anas rubripes* 和 *Branta canadensis*。

用于选择有效动物生长的方法

发明背景

技术领域

本发明一般性涉及动物育种方法。更特别地，本发明涉及基于动物的免疫细胞亚型(subtype)的数量和淋巴细胞的增殖性应答的频率而在两或多个动物之中选择健壮性(robustness)的方法。

背景技术

动物具有一种复杂的分子和细胞防御阵列，统称为免疫系统，其识别并攻击潜在的有害的外源或内源但异常的细胞(分别例如是病原体，如细菌或病毒，及癌细胞或病原感染的细胞)，但其不攻击而是耐受内源的正常细胞。当受到外源或异常生物分子刺激时，免疫系统经历与外源或异常生物分子相关的、中和及破坏病原体或癌细胞或病原感染的细胞的一系列活性。统称作免疫应答的这些活性可以由细胞介导的免疫应答、体液(抗体介导的)免疫应答或包括细胞介导的应答和体液应答元件的一种免疫应答组成。

体液免疫应答由特异性结合外源或异常生物分子并吸引免疫系统的其它成分的抗体，糖蛋白介导。抗体是由 B 细胞产生的免疫球蛋白(Ig)分子，B 细胞是起源于鸟类囊(avian bursa)或哺乳动物骨髓但迁移至其它器官尤其是脾并在其中成熟的淋巴细胞(Robertson, 1983)。细胞介导的免疫应答是 T 细胞活性的结果，T 细胞是在动物的胸腺内成熟的淋巴细胞(Tizard, 1988)。T 细胞活性在动物体内不同的 T 细胞亚群(subpopulation)之中变化很大。胞毒性 T 细胞识别并破坏外源细胞(移植排斥)或者内源但异常的细胞(例如癌细胞或胞内寄生虫如病毒和细菌感染的细胞)。辅助 T 细胞与 B 细胞和胞毒性

T 细胞均相互作用并产生影响 B 细胞和胞毒性 T 细胞行为的生物分子，以分别促进和指导抗体产生及胞毒性活性 (Mosier, 1967)。还存在其它类别的 T 细胞，包括抑制性 T 细胞和记忆 T 细胞(Miedema and Melief, 1983; Tizard, 如前, pp. 225-8)。T 细胞的类别在某种程度上基于不同的 T 细胞在其表面上展示不同的 CD 抗原而区分。

为正确行使功能，动物免疫系统的 T 细胞和 B 细胞必须正确及可靠地鉴别大量的外源的非自身组合物或者内源但异常的组合物。免疫系统的识别和鉴别发生在分子水平。抗原，具有产生免疫应答潜力的一种分子组合物，是由一或多个分子大小的鉴别特征即表位组成的。具有包含例如 100 个氨基酸的氨基酸序列的一个多肽抗原可以包含许多表位，其中每个表位均是被多肽的一部分限定，其包含大约 3—大约 15 个氨基酸。可衍生自多肽的表位的数目估计有大约 1 千万个 (Tizard, 如前, p. 25)。

由动物的 T 或 B 细胞遭遇到的抗原必须经鉴别为是与正常内源（即自身）抗原相关，对其的免疫应答对动物有害，或者与外源或异常（非自身）抗原相关，对其应该发生免疫应答。可依此类推在人体对抗中的“友好或敌对”鉴别。如果免疫系统不能鉴别与非自身的侵袭病原体或肿瘤细胞相关的抗原，则这些“敌人”可以逃脱免疫系统的防御。如果免疫系统将一种动物的内源抗原错误地鉴别成是非自身的，则动物体包含该内源抗原的那部分将面临来自免疫系统的“善意攻击”。后者的情况通常已知是“自身免疫疾病”，其中动物的免疫系统错误发动对抗动物体另外的正常部分的细胞和分子“战争”。

作为免疫系统鉴别抗原的手段的一部分，个体 T 细胞和 B 细胞产生抗原受体，该受体展示于 T 或 B 细胞表面上并特异性结合抗原。尽管每个个体 T 或 B 细胞均展示相同的抗原受体，但动物的不同抗原受体的集合非常多样。就 T 或 B 细胞而言，抗原与细胞抗原受体的结合激活该细胞，即刺激该细胞进行与产生细胞介导的或体液免疫

应答相关的活性。尽管 B 细胞可以直接结合抗原，但 T 细胞仅当抗原在通常称为抗原呈递细胞(APC)的其它特殊类别细胞上展示时才对其应答。APC，例如巨噬细胞和树状细胞，呈递通过糖蛋白衍生自多肽的抗原，所述糖蛋白如在 APC 表面上展示的 MHC（主要组织相容性复合物）蛋白(Bevan et al., 1994)。没有 MHC 蛋白，T 细胞则不能区分外源或内源抗原。

在过去的十年中，大多数家畜业已经揭示了估计育种值(breeding value)以可以鉴别最佳的育种动物。这些估计育种值是基于来自各个动物及其相关物的一些性状信息进行计算的，代表最精确的标准以鉴别具有高度遗传优势的动物。然而，普遍认为环境攻击如疾病限制了动物如猪的“真实”遗传潜力的表达。这也许是由于在与在商业生产中遭遇的环境显著不同的高健康状态单位中发生选择所致。在许多植物和动物系统中观测到这种健康状态的退化及伴随的繁殖期间个体性能的降低。与其它农业系统系统一样，现代家畜业需要在不同商业设置下表现优异的健壮动物。

因此，需要揭示可以鉴别和/或分选针对特定的生产系统最合适的动物的工具。由于动物免疫系统在其整个健康状态中的重要性，因此在动物的优良品性与动物具有的特异的免疫细胞的数量之间存在相关性是可能的。相似地，在优良品性与特殊的免疫细胞的功能性之间存在相关性也是可能的。

发明概述

根据本发明的一方面，本发明提供了在两或多个动物之中选择健壮性的一种方法，所述方法包括提供相同物种的两或多个动物；确定每个动物中 CD16 抗原表达细胞的数量；及选择 CD16 抗原表达细胞数量最低的动物。

根据本发明的另一方面，本发明提供了在两或多个动物之中选择

健壮性的一种方法，所述方法包括提供相同物种的两或多个动物；确定每个动物中 CD16 和 CD2 双阳性抗原表达细胞的数量；及选择 CD16 和 CD2 双阳性抗原表达细胞数量最低的动物。

根据本发明的再一方面，本发明提供了在两或多个动物之中选择健壮性的一种方法，所述方法包括提供相同物种的两或多个动物；确定每个动物中 CD8 抗原表达细胞的数量；及选择 CD8 抗原表达细胞数量最低的动物。

根据本发明的又一方面，本发明提供了在两或多个动物之中选择健壮性的一种方法，所述方法包括提供相同物种的两或多个动物；确定每个动物中 MHC-DQ 抗原表达细胞的数量；及选择 MHC-DQ 抗原表达细胞数量最高的动物。

根据本发明的另一方面，本发明提供了在两或多个动物之中选择健壮性的一种方法，所述方法包括提供相同物种的两或多个动物；确定每个动物中表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQB 的抗原的细胞的数量；及选择表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQB 的抗原的细胞数量最高的动物。

根据本发明的另一方面，本发明提供了在两或多个动物之中选择健壮性的一种方法，所述方法包括提供相同物种的两或多个动物；确定每个动物中表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQD 的抗原的细胞的数量；及选择表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQD 的抗原的细胞数量最高的动物。

根据本发明的又一方面，本发明提供了在两或多个动物之中选择健壮性的一种方法，所述方法包括提供相同物种的两或多个动物；确定每个动物中 CD4 抗原表达细胞的增殖频率；及选择 CD4 抗原表达细胞增殖频率最低的动物。

在其中可以选择健壮性的物种包括但非限于：*Bos taurus*(牛)、*Sus scrofa* (猪)、*Ovis aries* (绵羊)、*Bison bison* (野牛)、*Babalis babalus* (水

牛)、*Gallus domesticus* (鸡)、*Meleagrus gallopavo* (火鸡)、*Anas rubripes* (鸭)和 *Branta canadensis* (鹅)。

预期本发明所述的每种方法可以单独使用或者彼此组合使用以选择最健壮动物。

发明详述

本发明提供了在两或多个动物之中选择健壮性的方法。

定义

本文所用术语“健壮性 (robust 或 robustness)”是指动物的一般状态，特征在于高于平均水平的(1)一生平均日增重(ADG)，(2)热胴体测定及(3)饲料转化。

本文所用术语“CD”是指分化簇。这个名称是已经开发了单克隆抗体的白细胞抗原的国际标准名称。

本文所用术语“抗体”是指在暴露于抗原时由 B 细胞合成的一种蛋白质分子，其能与所述抗原特异性组合；术语“单克隆抗体”是指由杂交瘤产生的一种抗体分子，其仅含有能与抗原的一个特殊表位免疫反应的一个抗原结合位点的一个种类。“初级”抗体是直接结合抗原的抗体。“二级”抗体是结合初级抗体的抗体。

本文所用术语“抗原”是指一种分子或组合物，其诱导动物体内免疫应答，并与动物的免疫系统的抗原识别成分特异性相互作用。

本文所用术语“促分裂原”是指一种化合物，其刺激淋巴细胞经历细胞周期。T 细胞的一种合适的促分裂原是伴刀豆球蛋白 A 和植物凝集素 (PHA)。

确定抗原表达细胞的百分比

在具有包括表达 CD16、CD2、CD8 和 MHC-DQ 抗原的细胞以及表达由 MHC-DQ 抗体靶向为 MHC-DQ 亮(B)或 MHC-DQ 暗(D)抗原的细胞的动物中确定抗原表达细胞百分比优选通过如下步骤实

现：从动物体分离周围血单核细胞(PBMC)；将 PBMC 与特异的感兴趣的抗原的一种初级单克隆抗体温育；将 PBMC 用与荧光染料缀合的一种二级抗体标记；计数表达感兴趣的抗原的 PBMC；及计算表达感兴趣的抗原的 PBMC 百分比。

确定抗原表达细胞的增殖频率

在具有包括表达 CD4 抗原的细胞的动物中确定抗原表达细胞增殖频率优选通过如下步骤实现：从动物体分离周围血单核细胞(PBMC)；将 PBMC 用一种合适的荧光染料标记；将 PBMC 用一种合适的母细胞形成培养基 (blastogenic medium) 培养；将 PBMC 与一种促分裂原温育；将 PBMC 与特异的感兴趣的抗原表达细胞的一种单克隆抗体温育；及确定已经增殖的感兴趣的抗原表达细胞的频率。

分离 PBMC

PBMC 优选使用一种淋巴细胞分离培养基通过梯度分离而分离。一种合适的淋巴细胞分离培养基是 LSM® (ICN Biomedicals)。

计数抗原表达细胞

在本发明中，特异性抗原表达细胞的计数及表达该抗原的 PBMC 百分比的最终确定优选通过流式细胞计量术实现，更特别地使用荧光流式细胞计量术实现。一般而言，流式细胞计量术包括在一个时间将细胞一次一个地穿经一个流槽 (flow cell) 的感应区。由于细胞是一次一个地穿经流槽，因此典型地需要在分析之前稀释细胞样品，以便可以分离各个细胞进行感应。

荧光流式细胞计量术结合荧光细胞分析与光散射的原理。一般而言，这需要将细胞用一种合适的染料染色，或者一种荧光染料标记在细胞表面上共价地附着于抗原或抗体，因此表明特异性抗原-抗体反应的发生。

在荧光流式细胞计量术中，将一种预先染色的或荧光标记的颗粒的悬浮液，特别是于血液或其它生物学液体样品中的细胞，转运经过

一个流槽，在此处样品中的各个颗粒用一或多个聚光束照亮。用一或多个检测仪检测光束与通过流槽流动的标记颗粒之间的相互作用。通常，一些检测仪被设计为测定荧光发射，而其它检测仪测定散射强度或脉冲持续时间。因此，穿经流槽的每个颗粒均可以定位于一个特征空间，其轴是发射颜色，光密度或其它性质，即通过检测仪测定的散射。优选地，样品中的不同颗粒可以定位于特征空间的不同的且不重叠的区域，使得每个颗粒均基于其在特征空间的定位而被分析。

增殖频率的确定

在本发明中，已经增殖的抗原表达细胞的频率的确定优选通过在此所述的流式细胞计量术实现。流式细胞增殖频率数据分析优选使用含有增殖模块的软件程序实现，如 ModFit LT(Verity Software House, Inc., Topsham, Maine)。增殖频率测定基于这样的原理，即细胞的每个世代应具有亲代细胞大约一半的染料。

单克隆抗体

单克隆抗体组合物典型地展示对与其免疫反应的一特定的蛋白质的单一结合亲和性。一种抗原的一个表位(即 CD2)的一个单克隆抗体可以通过使用由培养的连续细胞系生产抗体分子的技术而制备。这些技术包括但非限于最初由 Kohler 和 Milstein 描述的杂交瘤技术，及最近的人 B 细胞杂交瘤技术(Kozbor et al., 1983)，EBV-杂交瘤技术(Cole et al., 1985)，及三瘤(trioma)技术。可用于本发明中有效产生单克隆抗体的其它方法包括噬菌体展示技术(Marks et al., 1992)。

一般地，Kohler 和 Milstein 的杂交瘤技术是用一种蛋白质或其片段对动物进行免疫而开始。免疫典型地通过为免疫感受态的哺乳动物给予免疫有效量的免疫原而实现。优选地，所述哺乳动物是一种啮齿动物，如兔、大鼠或小鼠。然后将该哺乳动物维持足够长的一段时间，使得该哺乳动物产生分泌与所述免疫原免疫反应的抗体分子的细胞。这种免疫反应通过筛选如此产生的抗体分子与一种免疫原蛋白制品

的免疫反应性而检测。任选地,可以希望用一种蛋白质制品筛选抗体分子,所述蛋白质制品是在一个分析中可以被所述抗体分子检测的形式,例如膜结合形式的抗原(即 CD2)。这些筛选方法是本领域技术人员所熟知的。接下来,制备一种产生抗体的细胞的悬浮液,该细胞从分泌所希望的抗体的每个接种的哺乳动物中取出。在足够的时间之后,处死该哺乳动物并从中获得体细胞抗体生产淋巴细胞。产生抗体的细胞可以得自接触过抗原的动物的淋巴结、脾和外周血。优选脾细胞,可以使用本领域熟知的方法将其在生理耐受的培养基中机械地分离成单个的细胞。小鼠淋巴细胞提供较高百分比的与下述小鼠骨髓瘤的稳定融合体。也可以使用大鼠、兔和青蛙的体细胞。将编码希望的免疫球蛋白的脾细胞染色体通过将该脾细胞与骨髓瘤细胞融合而无限增殖化,一般在存在融合剂如聚乙二醇(PEG)的情况下进行。根据标准技术,任何数目的骨髓瘤细胞系均可以用作一种融合配体。

然后将所得细胞包括希望的杂交瘤在一种选择培养基如 HAT 培养基中生长,其中未融合的亲代骨髓瘤或淋巴细胞最后死亡。只有杂交瘤细胞存活并可以在限制稀释条件下生长以获得分离的克隆。筛选杂交瘤的上清中所希望的特异性抗体的存在情况,如使用已经用于免疫接种的抗原通过免疫分析技术进行。然后将阳性克隆在限制稀释条件下亚克隆并可以分离产生的单克隆抗体。有许多单克隆抗体的分离和纯化方法以使其从其它蛋白质或其它污染物中游离出。纯化单克隆抗体通常使用的方法包括硫酸铵沉淀、离子交换层析和亲和层析(见例如 Zola et al., 1982)。根据这些方法产生的杂交瘤可以使用本领域已知的技术在体外或体内增殖(在腹水中)。

通常地,可以将单个的细胞系在体外增殖,例如在实验室培养容器中增殖,含有高浓度的单一特异性单克隆抗体的培养基可以通过倾析、过滤或离心而收获。或者,单克隆抗体的产量可以通过将一种杂交瘤样品注射入组织相容的动物中而增强,用于提供体细胞和骨髓瘤

细胞以进行最初的融合。分泌由融合的杂交细胞产生的特异性单克隆抗体的肿瘤在经注射的动物中发育。动物的体液，如腹水或血清提供高浓度的单克隆抗体。

用于制备这些组合物的培养基和动物为本领域所熟知并通常是可以商购的，包括合成的培养基、近交小鼠等。一种合成的培养基例如是补加了 4.5gm/l 葡萄糖、20mM 谷氨酰胺和 20%胎牛血清的 Dulbecco's 极限必需培养基(DMEM; Dulbecco et al., 1959)。一种近交小鼠例如是 Balb/c。

荧光染料/标记

可用于确定 PBMC 样品中存在的免疫细胞亚型百分比的荧光标记包括但非限于：藻红蛋白(PE)、异硫氰酸荧光素(FITC)、别藻蓝蛋白 (APC)、得克萨斯红(TR, Molecular Probes, Inc.)、多甲藻素叶绿素复合物(PerCp)、CY5 (Biological Detection System)及其与 PE 偶联的缀合物(例如 PE/CY5、PE/APC 和 PE/TR)。可用于确定免疫细胞亚型的增殖频率的荧光标记包括但非限于 PKH 染料，如 PKH2、PKH26 和 PKH67。

在前面的讨论中，包含来自许多专业杂志和专利的引用用来参考。所有这种引用在此均以其全文并入参考。

实施例 1

动物

对 199 头猪的生产行为监测大约 7 个月。所述猪是 3 种不同的内基因型 (internal genotype) 的产物：AxC、BXC 和 BXD 基因型。在这个试验中使用总共 18 头公猪；8 头公猪有 10 个以上的子代，其它 10 头子代低于 10 个。群体中雄性与雌性比率为 1—1.3。

动物流程

猪在农场 A，场所 I 出生。场所 I 包括饲养、妊娠和生产单位。

将小猪用母猪乳汁喂养大约 19 天。母猪的喂食符合或超过国内哺乳曲线标准 (internal lactation curve guidelines)。

每周通过生产 (farrowing)、保育 (nursery) 及生长肥育室进行一次猪流程, 然后当该猪符合特异性目标重量时将猪移至下一个阶段。保育猪的目标重量是 4–6.5 kg, 测试时期的重量为 31.7 kg, 测试结束时重量为 122.31 kg。

将所有猪均在出生后 24 小时开始处理。每头猪单独称重(Mosdal scale model IQ-plus 390-DC)并用钮扣状耳部标签识别。为每头猪给予葡聚糖铁(Durvet, Inc)和青霉素(Pfizerpen®G, Pfizer)的 1 cc 混合物及 1 cc 庆大霉素(Garacin®, Schering Plough)以预防腹泻。

在断奶时期, 即在 19 天龄左右, 将每头猪单独称重并用颜色标记。将猪运至场所 II 的保育室, 在此圈养至少 7 周。场所 II 包括保育室和生长肥育室。有 9 个保育室, 将猪按性别和重量关入栏中 7 周, 与其它相同年龄和产品基因型的非实验猪同样分配圈养。实验对象是共 15 头猪/栏。执行一个 4 阶段保育程序以及一个严格饲料预算程序。将猪在第 10 天龄和第 24 天龄用副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*)菌苗(Suvaxyn® Respifend® Hps, Fort Dodge Laboratories)接种。

从 6–7 周龄的每头猪中通过前腔静脉穿刺获得血液, 并收集于含有抗凝剂(EDTA)的两个 10ml 试管中。将血样在全部时期均保持在具有冰袋的冷却器中并通过连夜交货递送服务送至实验室处理。血样收集与实验室处理之间的时间为 20 小时或更少。将血液取样 11 个批次以便于实验室处理, 每次引流最多取 25 个血样。

在 9 周龄时, 将猪称重并将达到 31.7 kg 目标重量的动物从保育室中移至生长/肥育室中进行实验。用 2–4 个保育室充填一个生长/肥育室。将猪与相同年龄和基因型的其它未选择的猪一起圈养。将每个栏中选择的猪同样地标示。在肥育室的一个房间内分配 8 个栏的 60 头阉过的公猪和 60 头母猪。利用 6 栏圈养室共圈养 720 头猪。将

猪在所有房间中温度最小变化($21.6^{\circ}\text{C} - 19.4^{\circ}\text{C}$)的条件下圈养并用 4 阶段 (four-phase) 基于玉米-大豆的饮食程序进行喂食。

在测试时将每头猪单独称重(True-Test model 700 scale)。另外, 使用实时超声(Aloka model SSD-500 V)进行活体测定, 包括测定在第一肋的背膘、最后肋(背膘)、最后椎骨及腰肉深度 (loin depth)。每两周将每头猪称重直至该猪达到结束实验时的目标重量 122.3 kg。

在测试结束时, 将猪运至 Swift 屠宰设备(Louisville, KY)屠宰。收集的胴体性状包括热胴体重量, fat-o-meter 仪测得的背膘, fat-o-meter 仪测得的腰肉深度和瘦肉百分比。

农场健康状况

在实验期间兽医每月视察一次农场 A。兽医对保育室和生长/肥育室中的临床疾病和死亡率的存在情况进行评估。认为农场 A 具有低至中等水平的沙门氏菌属 (*Salmonella*) 暴露水平, 通过历史血清学研究认为是猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) 阳性。

对农场进行持续监测以使用爱荷华州立大学的 Danish Mixed ELISA 检测沙门氏菌属抗体。沙门氏菌属监测结果(10 头肥育猪/月)表明在本研究期间无活性血清转化, 沙门氏菌属的血清转化在前几年已经出现。未观测到沙门氏菌属的临床迹象。每年评估一次猪肺炎支原体血清学。在这项研究的最后一个月期间, 在明尼苏达州大学诊断实验室通过 Tween-ELISA 试验检测到 10 头肥育猪中有 3 头具有抗猪肺炎支原体的抗体。

药物/饲料添加程序

在保育前及保育饮食中, 200g/吨硫酸新霉素和土霉素 (Neo-Terramycin®, Pfizer) 用作常规饲料添加程序的一部分。

细胞制备

在实验室中, 使用在别处描述的淋巴细胞分离培养基 (LSM, Cappel, ICN Biomedicals, Ohio) 通过梯度分离从所有 199 个猪血样中

分离周围血单核细胞(PBMC) (Solano-Aguilar et al., 2000)。在 PBMC 分离后, 使用锥虫蓝染料排除法计数细胞并将其活细胞浓度调整为 5×10^7 个细胞/ml。不是所有的猪样品均用于所有免疫鉴定。

细胞类型和单克隆抗体

天然杀伤细胞(NK)是具有杀死某些肿瘤细胞及众多病毒感染的细胞能力的细胞。这种杀伤是天然的而不是特异性免疫。在猪中, NK 细胞分别使用 CD2 和 CD16 猪单克隆抗体(MAb) MSA3 和 G7 而被鉴别为 CD2+/CD16+双阳性细胞。CD2 MAb 检测 T 淋巴细胞, CD16 MAb 检测 III 型 Fc γ 受体(Fc γ RIII)。

NK 对靶细胞的杀伤需要靶细胞被特异性免疫球蛋白(IgG)预先包被, 裂解过程称为抗体依赖性细胞介导的胞毒性。结合的抗体的识别通过白细胞上 IgG Fc 的低亲和性受体 Fc γ RIII 而发生, 所述受体在猪中用 CD16 MAb 检测。

SLA (猪主要组织相容性复合物)分子在抗原识别中起重要作用。它们靶向于特异的抗原, 因此 SLA 属于特异性免疫系统。有两类 MHC 分子, 即 I 类和 II 类。CD8+细胞是胞毒性最强的 T 淋巴细胞(CTL), 其识别细胞上与 I 类 MHC 分子结合的肽片段, 这是 CTL 的裂解作用的靶位。这些肽通常衍生自内源合成的蛋白质, 如病毒抗原。CD4+细胞是最强的辅助淋巴细胞, 其识别其它细胞, 如 B 细胞、巨噬细胞及在猪中激活的 T 细胞的一些亚群(subset)表面上与 II 类 MHC 分子结合的肽。II 类相关的肽通常衍生自胞外微生物和可溶的蛋白质抗原。CD4+和 CD8+淋巴细胞亚群可以分别使用 74-12-4 和 76-2-11 MAb 检测。

在人和猪 MHC 和 SLA 基因座中, 有与众不同的染色体区域, 如 DP、DQ 和 DR。在猪中, SLA-DQ 抗体靶向 SLA-II 抗原, 分别为 SLA-DQ 总体(T)、亮或活性(B)及暗或低活性(D)。SLA-DQ MAb 识别 SLA-DQ 分子上的一个被认为是所述区域的一个共同成分的单

态决定簇而非识别一个多态决定簇(SLA-DQ 基因表达多态性产物)。

在从全血中分离 PBMC 后,在两种条件下测试淋巴细胞。首先,将 PBMC 等份直接免疫染色并通过将 PBMC 与初级猪 MAb 一起温育测定免疫细胞亚群的百分比。其次,将 PBMC 等份与促分裂原伴刀豆球蛋白 A(ConA, Sigma, St. Louis, MO)一起培养,使用流式细胞计量术及组合 MAb 和 PKH67 染色(Sigma, St. Louis, MO)测定细胞亚群的增殖性应答。PBMC 群中单克隆抗体及其靶细胞列于表 1。这个研究中应用的所有单克隆抗体均是猪特异性的,其靶细胞特异性已经在别处加以描述(Saalmueller et al., 1998 和 Haverson et al., 2000)。选择这些 MAb,因为其靶向单核细胞和淋巴细胞上表达的表面标记。一种抗猪泛白细胞(panleukocyte)标记(CD45)和多重 IgG 同种型对照 MAb 分别用作阳性和阴性对照。

在用与 FITC 或 PE(Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL)偶联的二级单克隆抗体标记细胞之后,确定用特异性 MAb 免疫染色的细胞的百分比。

表 1: 猪单克隆抗体及 PBMC 中的靶细胞

细胞亚群(或组合)	单克隆抗体	靶细胞
CD2+/CD16+		表达 CD2 和 CD16 的双阳性淋巴细胞; 天然杀伤(NK)细胞
CD16	G7	主要由多个细胞亚群: NK、B、巨噬细胞 表达的低亲和性受体 FcγRIII
CD2	MSA3	绵羊红细胞受体;主要在 T 细胞和 NK 细 胞上表达,在 B 细胞上暗淡(dull)
CD4+/CD8+		表达 CD4 和 CD8 的双阳性 T 淋巴细胞; 正常时暗淡的 CD8
CD4	74-12-4	与抗原呈递细胞(APC)上的 MHC II 型 抗原和外来抗原反应的 T 淋巴细胞亚群
CD8	76-2-11	与 APC 上的 MHC I 型抗原和外来抗原反 应的 T 淋巴细胞亚群

SLA-DQ T	TH-16	猪 II 类淋巴细胞抗原 (SLA); 相当于小鼠 MHC II 类 I-E 抗原; T=总 PBMC (单核细胞和淋巴细胞)
SLA-DQ B		SLA-II B; 仅检测 SLA-DQ 亮淋巴细胞和/或巨噬细胞
SLA-DQ D		SLA-II D; 检测 SLA-DQ 暗淡或活性较低的淋巴细胞和/或巨噬细胞

流式细胞计量术分析

使用在别处描述的流式细胞计量术分析免疫染色的 PBMC (Solano-Aguilar et al. 2001)。基于荧光强度计算染色的细胞的百分比, 使用 IgG 同种型背景作为对照。就某些标记而言, 重要的是区分暗(D)与亮(B)的免疫荧光, 因此报道了 SLA-DQ 的总(T)、D 和 B 群。针对每个样品的流式细胞计量术分析包括 16,000—20,000 个结果。

PKH67 染色

为进行增殖测试, 将 PBMC 在 RPMI 1640 培养基中洗涤一次, 随后通过于 17×100ml 的聚丙烯锥型试管中的尼龙网过滤。将细胞沉淀置于稀释液 C (Sigma, St. Louis, MO) 中, 达到 5×10^6 个细胞/ml 的最终悬浮液。然后将该细胞悬浮液加入等体积的 PKH67 染料原液中 (1.5L 染料/ 1×10^7 个细胞), 在室温温育 3 分钟。预先确定细胞浓度以匀质及亮地染色细胞。将等于细胞+染料总体积的一倍体积的热灭活的胎牛血清加入该悬浮液中。然后将细胞离心沉淀 3 次, 第一次用 RPMI 培养基与血清洗涤, 最后一次在母细胞形成培养基(补加 5% FBS, 1mM 丙酮酸钠, 2mM L-谷氨酰胺, 非必需氨基酸, 5.5×10^{-5} M 2-巯基乙醇, 25mM Hepes 缓冲液的 RPMI 1640)中洗涤, 用血细胞计数器进行计数。染色程序的匀质在第 0 天针对这些标记的细胞等份通过流式细胞计量术检测。

增殖

将总共 8×10^6 个 PKH67-标记的细胞铺板于 24 孔组织培养板的

各个孔中。在培养开始时向该孔中加入最终剂量为 $5\mu\text{g/ml}$ 的伴刀豆球蛋白 A。培养基对照孔中无促分裂原。终体积为 2 ml/孔 。将该平板在 37°C 于 $5\% \text{ CO}_2$ 中温育 3 天。在培养 48 小时后, 将孔中上部 1ml 的培养基用 1ml 新鲜母细胞形成培养基更换。

收获细胞进行增殖分析

在第 3 天, 收集细胞, 在 RPMI 培养基中洗涤 2 次并计数。将 1×10^7 个细胞/ ml 的浓度进行如别处所述的示差免疫染色 (differential immunostaining) (Solano-Aguilar et al., 2001)。培养后, 将细胞用对照 MAAb 或 CD4 或 CD8 MAAb 染色。收集的数据用于计算在暴露于 ConA 后淋巴细胞的增殖以测定淋巴细胞的功能。在与 Con A 或与培养基一起培养的细胞之间对比 CD4 阳性(CD4+)、CD8 阳性(CD8+)及 PKH67 掺入(总细胞增殖)的增殖情况, 以确定在刺激后是否任何细胞亚群均潜在地增加。

免疫细胞增殖的数据分析

使用 ModFit LT 软件中 Proliferation Wizard 模块分析流式细胞计量数据(Verity Software House, Inc., Topsham, Maine)。将细胞根据淋巴细胞群的前向散射和侧向散射信号进行门控以除去细胞碎片。非增殖性(亲代)细胞的强度通过分析不与促分裂原一起培养的样品而确定。每个细胞的世代应具有大约一半的亲代细胞的 PKH67 染料。从亲代的强度研究中, ModFit 软件以不同的通道间隔用以峰为中心的高斯分布去卷积 (Deconvolute) 荧光密度柱状图(Givan et al., 1999)。使用软件回报的在分析时每个雌性子代中细胞的百分比数据, 计算已经增殖的(前体频率或 PF)原始群体中每个细胞亚群(CD4+, CD8+, PKH67+)的各个频率。计算的增殖指数(PI)是所有世代中的细胞总和除以未刺激的群体中理论上存在的原始亲代细胞数。PI 是实验期间(3 天)培养的细胞数增加的一种测定方法。使用的前体频率和增殖指数是淋巴细胞增殖的测定, 而且在这个研究中认为是功能性分析。

作为生长指标的免疫参数的测试

评估的生产参数包括在如下生长阶段的平均日增重(ADG): a)测试期, b)从出生至断奶期, c)从出生至测试结束期或者一生日增重, d)断奶至测试结束期, 及 e)断奶至测试期。对额外的生产参数如活体和胴体测定、饲料摄入量及饲料转化也进行分析。

增殖分析(PF 和 PI)和免疫表型(表达 CD16、CD2 等的细胞的百分比)对生产参数的作用通过将其在一个混和模型分析中作为回归量而加以评估。

使用一个混和模型(SAS Proc. MIXED)确定当评估生长性状的作用时应该应用哪些参数。使用的一个完整模型包括产品、种公畜 (嵌套在产品内)、保育室、肥育室、性别、母猪的胎次 (parity of sow), 其中公畜是一个随机作用, 所有其它因素均是固定的。种公畜由于部分混杂而嵌套在产品内。当针对产品内的种公畜测试时未发现产品是显著的, 因此从最终的模型中排除。保育室和肥育室是非常混杂的, 因此最终模型中只包括保育室, 因为其产生最显著的作用。

评估免疫细胞亚型标记对增殖分析和生产性状的预期作用以及增殖分析对生产性状的预期作用。这些作用的最终模型示于表 2。

表 2: 参数模型

增殖分析	种公畜 (产品) + 保育室 + 性别
免疫标记	种公畜 (产品) + 保育室 + 性别 + 胎次
活体/胴体性状	种公畜 (产品) + 保育室 + 性别 + 胎次 + 测量时体重
饲养参数	种公畜 (产品) + 保育室 + 胎次

结果:

通过使用 ModFit 程序进行的流式细胞计量术分析的数据表明 99.37%的细胞被 PKH67 染色, 论证了该程序的高效力。用 CD45 泛白细胞 MAbs 获得的结果表明平均 92.04%的分离的细胞由 CD45 单克

隆抗体识别为白细胞，表明一种适当的淋巴门控。背景染色通过使用 IgG 同种型对照物而对照。所有使用的 MAbs 均示出比背景对照更高的值，表明该检测系统是有效的。

在血液中检测的免疫标记的比例是针对一个典型的猪(猪 1867)给定的：CD4 (14.92%)、CD8 (48.24%)、CD4/CD8 (8.32%) SWC3 (4.12%)、SLADQ T (46.4%) SLADQB (16.34%)、SLADQ D (30.06%)、CD16 (20.16%) CD2 (63.32%)、CD2/CD16 (18.98%)、CD21 (7.26%)。对照物百分比是：IgGa/Ig2b (0.4/0%)、Ig2a/IgG1 (0.22/.06, CD45 (98.38)。正如所期望的，一些免疫细胞亚群，如 CD8、CD16、CD2/CD16 是相对富集的。其它标记如 SWC3 和 CD21 的相对百分比在循环血中较低，但仍有时高于背景水平。

平均断奶期重量为 $6.4 \text{ kg} \pm 0.16$ ，平均断奶龄是 $19.4 \text{ 天} \pm 0.2$ 。在断奶时，76%的小猪重量处于 9.0—14.5 磅的重量范围；其余的，1%的猪重量 < 8.9 磅，23%的猪重量 > 14.6 磅。平均开始测试时重量为 $33.3 \text{ kg} \pm 0.5$ ，平均开始测试时龄为 $70.8 \text{ 天} \pm 0.6$ 。平均测试结束时重量为 $123.1 \text{ kg} \pm 0.7$ ，平均测试结束时龄为 $166.8 \text{ 天} \pm 0.9$ 。

这些发现是在猪初始生产阶段重量相似而不是年龄相似进行的猪流程下观测的。认为对猪流程中的重量加以标准化对在猪中对比性能是重要的，其中 ADG 和胴体评估是测定的性状，因为猪的重量将影响日增重。相似地，针对胴体性状进行的关联分析考虑到在测定时的动物重量。

线性模型分析的结果表明全部增殖分析受到种公畜和性别的影响；增重性状受到种公畜、保育室和肥育室、性别及母猪胎次的影响。活体和胴体测定受到产品、种公畜、性别和母猪胎次的影响。

在考虑了各种来源的差异之后，在免疫标记与生产效能之间发现显著关联。这些关联是在涵括取血样时期（保育室）的特殊生产阶段发现的，但是它们与其它生产阶段也关联，提示这些标记可以在猪的

整个生产寿命期预测生产效能。

淋巴细胞增殖

发现免疫细胞亚型标记是淋巴细胞增殖的良好指征。总细胞增殖频率(PKH67 PF)受到 CD4+($p=0.09$)和 SLA-DQT+细胞($p=0.009$)的百分比的影响。总细胞增殖指数(PKH67 PI)显著受到 SLA-DQB+细胞的百分比($p=0.009$)影响。最后, CD8+细胞的增殖频率受到 CD4+/CD8+细胞($p=0.07$)、CD8+($p=0.03$)和 SLA-DQD+($p=0.06$)的百分比的影响。

日增重

免疫细胞亚型标记预示 ADG。三种表型与猪的终生 ADG 显著相关, 包括 CD16+细胞($p=0.02$)、CD2+/CD16+细胞($p=0.0053$)、CD8+细胞($p=0.04$) (表 3)。一种功能性分析与猪的终生 ADG 相关: CD4 PF ($p=0.08$)。这四种表型与生长负相关, 标记的较高百分比与较低的 ADG 相关。

研究标记对生长的影响的另一种方式是对比 tails 或 extremes。然而必须指出的是如上述使用的回归模型是比查看 extremes 更好的指示, 因为其包含所有数据。然而, 为评估 CD2+/CD16+细胞的频率对终生 ADG 的影响, 在示出这些细胞亚群的最高百分比的 30 头猪与示出最低百分比的 30 头猪之间对比增重和出栏的平均天数。计算增重是将 ADG 乘以达到测试结束时重量所必需的平均天数(所有猪平均为 166.8 ± 0.9 天)。计算出栏平均天数是将测试结束时的目标重量 116 kg 除以相对于所述最低百分比的 30 头猪的最高的 ADG。

结果表明在 CD2+/CD16+细胞中增加 1% 预期使终生 ADG 降低 0.0018 kg。最低 30 个应答者的 CD2+/CD16+细胞平均为 5.4%, 最高的 30 个平均为 33.1%。这意味着终生增重的预测差异是 $(33.1 - 5.4) \times 0.0018 = 0.0498$ kg/天。就 167 天而言, CD2+/CD16+细胞的高和低 % 之间的差异为大约 8.32 kg。

具有较高比例双阳性细胞的猪的 ADG 为 0.7556 kg, 因此达到测

试结束时 116kg 的目标重量需要平均 156 天。表达高比例 CD2+/CD16+细胞的猪需要 166 天达到同样的目标重量，在组之间有 10 天的差异。

一些表型标记和增殖性应答与在特定的生产阶段、而非猪的整个生产终生 ADG 显著相关。这些包括：CD4+细胞与从出生至断奶的 ADG 相关($p=0.04$)，SLA-DQB+细胞与从断奶至测试时的 ADG 相关($p=0.08$)，及 SWC3+细胞与测试时 ADG ($p=0.07$)及从断奶至测试时 ADG($p=0.09$)相关。所有这些关联均具有正相关，较高的细胞百分比对应较好的 ADG(表 3 和 4)。

胴体测定

发现活体测定与细胞亚型标记及增殖分析之间的显著关联。这些关联包括在测试时 CD4+/CD8+细胞与最后的椎骨($p=0.015$)，在测试结束时 CD8 PF 与第一肋骨($p=0.08$)及在测试时 SLA-DQD 与背膘($p=0.08$)之间的关联(表 4)。当在屠宰场评估同一组的动物的胴体性状时，这些关联不明显。

表达猪白细胞抗原(SLA) II 型或 SLA-DQ 标记的细胞的比例显著影响重要的胴体性状。SLA-DQB+和 SLA-DQT+细胞的比例与热胴体重量关联($p=0.04$)。该相关性是正的，较高比例的 SLA-DQB 和 T 阳性细胞与较高的热胴体重量相关(表 4)。

饲料摄取与效力

饲料摄取与 SLA-DQD+细胞($p=0.04$)和 SLA-DQT+细胞($p=0.06$)的比例显著关联。SLA-DQ 标记与饲料转化也关联。SLA-DQB+ ($p=0.05$)，SLA-DQD+ ($p=0.06$)和 SLA-DQT ($p=0.015$)与饲料转化显著关联。具有较高 SLA-DQ 阳性细胞百分比的猪示出较好的饲料转化。高水平的 CD8 PF 与较差的饲料转化相关($p=0.09$)。

在生产参数与 CD2+、CD21+、CD4 PI、CD8 PI、PKH67 PI 或 PKH67 PF 之间发现无关联性。

总而言之,得自经济学观点的更多相关结果是免疫表型与猪的终生 ADG、胴体性状及饲料转化之间的显著相关。因此,将阐述由参与这些关键关联的抗体靶向的免疫细胞或细胞亚群的生物学方面的内容。

在猪的整个生产寿命期间,在 CD2+/CD16+细胞与增重性状之间发现显著关联。这些双阳性细胞最可能是 NK 细胞。NK 细胞具有杀死某些肿瘤细胞和广泛的病毒感染的细胞的能力。这种杀伤不是由特异的抗原诱导的,因此是天然免疫性而不是特异性免疫性的一部分。NK 细胞能裂解多种靶细胞。NK 介导的胞毒性的水平典型地不是由抗原调节的,而是由细胞因子和激素,如白细胞介素-2、干扰素(IFN)、促乳素及生长激素调节的。NK 细胞还分泌 IFN- γ , 其激活单核细胞发育为巨噬细胞。

在猪的整个生产寿命期间,在 CD16+细胞与增重性状之间发现显著关联。在许多情况中,NK 对靶细胞的杀伤需要该靶细胞预先用特异的 IgG 包被,该裂解过程称为抗体依赖性细胞介导的胞毒性。结合的抗体的识别通过白细胞上 IgG Fc 的一种低亲和性受体发生,该受体称为 Fc γ 受体 III (Fc γ RIII), 其由 CD16 MAb 检测。

尽管不存在鉴别猪中的 NK 细胞的绝对的标记,但作者相信从现今可以获得的单克隆抗体中,CD2/CD16 抗体的组合似乎是最合适的。在人体中 CD2 表达出现在胸腺细胞、外周 T 细胞和天然杀伤细胞上。其在 50%的胸腺 B 细胞上也表达,在成熟 B 细胞上的表达有争议。CD16 检测 Fc γ RIII。对于猪而言,一个 NK 细胞亚群据认为是 CD2+/CD16+。CD16 细胞亚群主要是由 T 和 NK 细胞表达的,但 B 细胞也可表达它。B 和 NK 细胞是 CD3 阴性的。猪中的 NK 细胞分为 CD8-和 CD8 暗淡细胞(dull cell)。B 细胞在这个研究中作为 CD16+细胞亚群来源的作用不显著,因为在 B 细胞抗原(CD21)与 ADG 之间无关联。

CD8⁺细胞是最毒性的 T 淋巴细胞(CTL)，其识别与是 CTL 的裂解作用目标的细胞上 I 型 MHC 分子结合的肽片段。这些肽通常衍生自内源合成的蛋白质，如病毒抗原。在这个研究中未研究 MHC I 型抗原。

CD4⁺淋巴细胞是最主要的辅助细胞，识别与其它细胞如 B 细胞、巨噬细胞及在猪中一些激活的 T 细胞亚群的表面上的 II 型 MHC 分子结合的肽。II 型相关的肽通常衍生自胞外微生物和可溶的蛋白质抗原。

SLA-DQ⁺细胞的比例示出与胴体性状和饲料转化的显著关联。SLA 或猪 MHC 分子在抗原识别中起重要作用。SLA-DQ 猪 MAbs 靶向 SLA II 型抗原，认为其与鼠 MHC II 型基因座，I-E 和人 HLA-DQ 相当。在基因水平，DQ 区域包含 α 和 β 链基因座；SLA-DQ 通常是一个 α 链和一个 β 链的异源二聚体，其是通过抗体检测的表面表达的产物。SLA-DQ 单克隆抗体识别 SLA-DQ 分子上的一个单态决定簇，认为其是 SLA-DQ 基因中一个基因的保守序列。

SWC3 MAbs 与在限制生产阶段中的 ADG 相关。SWC3 靶向单核细胞。单核细胞是这样的细胞群，其在天然免疫性中是关键性的，而且在特异的获得性免疫性中也起关键作用。单核细胞的一些功能是对外源颗粒的吞噬作用，产生杀死微生物并控制感染扩散的介质，产生细胞因子和生长因子，抗原呈递细胞功能及促进 T 细胞激活。

淋巴细胞高度增殖对生产参数如 ADG 和饲料转化具有有害作用。已经报道了在急性的沙门氏菌的攻击下，淋巴细胞增殖是沙门氏菌抗性和生长的一个良好指征。在该项研究中，在攻击之前血淋巴细胞的较高增殖性应答与在实验条件下疾病抗性和生长降低相关(Van Diemen et al., submitted)。在本研究中，高增殖性应答与对包括生长的生产参数的有害作用相关，其可能与亚临床疾病的抗性相关。最重要地，这种有害作用在商业背景的无特殊急性疾病的畜群中观测到，这

可能是健壮性的指征。

微生物暴露发生在不完全无菌的任何环境中。微生物暴露在最清洁的商业操作中也有存在。在这个研究中未评估猪暴露于特异的病原体，但是关联结果(ADG)指出关键的免疫细胞参与应答病毒(NK 细胞，CD8+细胞)和细菌感染(CD4+，SLA-DQ+，单核细胞)。这似乎甚至在一种如在农场 A 的情况中的其中没有明显病毒感染临床迹象的环境中是相关的。

一些因素可影响血液中的免疫标记的百分比，其中一种因素是接种。在保育前及保育阶段在 10 天龄和 24 天龄接种副猪嗜血杆菌菌苗。在收集血液进行细胞鉴定之前至少 3 周进行第二次接种。因为在第二次接种后在收集血样进行免疫染色之前的时间为至少 3 周，因此推测接种对免疫细胞群体无显著影响。

兽医的报道表明在农场 A，场所 II 中一些猪在研究期间的保育中示出临床疾病。这些迹象包括偶然看起来病态的猪，其发育不好，及咳嗽。整个保育及生长/肥育死亡率分别为 1—2%和 2%。这些百分比在商业操作中是在正常的死亡率范围内。因此，其测试免疫细胞的 98%的猪存活至测试结束时。199 头进行实验的猪中只有 4 头未存活至测试结束时。

在农场 A 进行的处理包括根据性别分栏，饲养方案，接种疫苗，猪密度，与许多商业操作相似。同样，暴露于沙门氏菌属和支原体的程度是在许多猪操作方案中共有的。因此，得自这个研究的结论可以推断相似的操作。在这个研究中的免疫细胞在其它动物物种中具有保守功能，这些细胞亚型标记可以潜在地用于更广泛的动物宿主谱系中。

表 3: 免疫细胞亚型(CD16, CD2/CD16, CD4, CD8)与增殖性应答、平均日增重、胴体性状及饲养参数之间的关联

依赖性性状	观察数	回归估值 (se)	P 值
CD16 的作用			
开始测试时的 ADG	136	-0.004 (0.0023)	0.095 ¹
从出生至断奶的 ADG	139	-0.002 (0.0009)	0.03 ¹
终生 ADG	136	-0.003 (0.0014)	0.02 ¹
断奶至测试结束时的 ADG	136	-0.003 (0.0014)	0.03 ¹
断奶至开始测试时的 ADG	139	-0.006 (0.0019)	0.0013 ¹
CD2/CD16 的作用			
开始测试时的 ADG	136	-0.005 (0.0023)	0.03 ¹
从出生至断奶的 ADG	139	-0.002 (0.0009)	0.011 ¹
终生 ADG	136	-0.004 (0.0014)	0.0053 ¹
断奶至测试结束时的 ADG	136	-0.004 (0.0014)	0.01 ¹
断奶至开始测试时的 ADG	139	-0.006 (0.0019)	0.003 ¹
CD8 的作用			
开始测试时的 ADG	137	-0.002 (0.0015)	0.021
从出生至断奶的 ADG	140	-0.001 (0.0006)	0.2
终生 ADG	137	-0.002 (0.0009)	0.04 ¹
断奶至测试结束时的 ADG	137	-0.002 (0.0009)	0.05 ¹
断奶至开始测试时的 ADG	140	-0.004 (0.0012)	0.005 ¹
CD4 PF 的作用			
开始测试时的 ADG	118	-0.099 (0.0932)	0.29
从出生至断奶的 ADG	120	-0.013 (0.0494)	0.8
终生 ADG	118	-0.109 (0.0624)	0.08 ¹
断奶至测试结束时的 ADG	120	-0.105 (0.0605)	0.09 ¹
断奶至开始测试时的 ADG	120	-0.0141 (0.0818)	0.09 ¹

¹ p<0.01 水平的显著性

表 4: SLA-DQ 亚型对胴体性状及饲养参数的作用

依赖性性状	观察数	回归估值 (se)	P 值
SLA-DQB 的作用			
开始测试时的第一肋	139	-0.0213 (0.0164)	0.2
测试结束时的第一肋	136	-0.001 (0.0462)	0.98
开始测试时的背膘	139	-0.005 (0.0122)	0.69
测试结束时的背膘	136	-0.019 (0.0333)	0.57
开始测试时的腰肉深度	139	-0.071 (0.3346)	0.83
测试结束时的腰肉深度	136	-0.0417 (0.055)	0.45
开始测试时的最后椎骨	139	-0.0004 (0.0195)	0.98
测试结束时的最后椎骨	136	-0.0059 (0.0258)	0.82
热胴体重量	131	-0.3587 (0.1753)	0.04 ¹
fat-o-meter 背膘	131	-0.003 (0.0347)	0.93
fat-o-meter 腰肉深度	131	-0.0509 (0.0792)	0.52
瘦肉百分比	131	-0.0078 (0.0249)	0.76
饲料摄入	105	0.0048 (0.0043)	0.27
饲料转化	105	0.0091 (0.0046)	0.05 ¹
SLA-DQD 的作用			
开始测试时的第一肋	139	0.0034 (0.0192)	0.86
测试结束时的第一肋	136	0.036 (0.0536)	0.51
开始测试时的背膘	139	-0.025 (0.014)	0.08 ¹
测试结束时的背膘	136	0.0130 (0.0388)	0.74
开始测试时的腰肉深度	139	0.3441 (0.3877)	0.38
测试结束时的腰肉深度	136	0.0615 (0.0638)	0.34
开始测试时的最后椎骨	139	0.0091 (0.0226)	0.69
测试结束时的最后椎骨	136	0.007 (0.0301)	0.82
热胴体重量	131	0.1956 (0.2101)	0.35
fat-o-meter 背膘	131	0.0164 (0.0402)	0.68
fat-o-meter 腰肉深度	131	0.0510 (0.0919)	0.58
瘦肉百分比	131	0.004 (0.0288)	0.9
饲料摄入	105	0.0109 (0.0053)	0.04 ¹
饲料转化	105	0.0111 (0.0058)	0.06 ¹
SLA-DQT 的作用			

开始测试时的第一肋	139	0.0122 (0.0118)	0.3
测试结束时的第一肋	136	-0.014 (0.0329)	0.67
开始测试时的背膘	139	-0.012 (0.0087)	0.17
测试结束时的背膘	136	-0.005 (0.0238)	0.85
开始测试时的腰肉深度	139	0.0942 (0.2394)	0.69
测试结束时的腰肉深度	136	0.0442 (0.039)	0.26
开始测试时的最后椎骨	139	0.0037 (0.0139)	0.79
测试结束时的最后椎骨	136	0.0005 (0.0184)	0.98
热胴体重量	131	0.2616 (0.1269)	0.04 ¹
fat-o-meter 背膘	131	0.0048 (0.0251)	0.85
fat-o-meter 腰肉深度	131	0.0466 (0.0573)	0.42
瘦肉百分比	131	0.0026 (0.018)	0.89
饲料摄入	105	0.0057 (0.0029)	0.06 ¹
饲料转化	105	0.0078 (0.0031)	0.015 ¹

¹ p<0.01 水平的显著性

实施例 2

将研究的猪群体的大小增加至额外 286 头猪。目的是收集更多的数据以证实免疫表型(CD16, CD2/CD16, CD8)与生产性能(生长)之间的关联。这个研究中的猪源自两个不同的农场,一个农场与实施例 1 的相同。动物的管理、生产性能的记录及免疫学性状的测定与实施例 1 所述相似。同样地,以与实施例 1 所述相同的方式进行统计学分析。针对第 1 年报道的关联分析包括 139 头动物。第 1 年和第 2 年的结果是共 425 头动物。见下表 5。

表 5: 免疫表型对平均日增重(ADG)的作用。使用的统计模型为: 种公畜(产品) + 保育室(年) + 性别 + 胎次。对于这个大小的数据集, p 值 > 0.1 的结果认为是显著的。粗体表示的结果代表第 1 年和第 2 年是合并在一起的。非粗体表示的结果是仅来自第 1 年。

CD16

生长参数	观察数	回归估值 (se)	P 值
开始测试时的 ADG	425	-.829 (.5170)	0.11
从出生至断奶的 ADG	139	-.002 (.0009)	.003
终生 ADG	425	-.580 (.3451)	0.09
断奶至测试结束时的 ADG	225	-.002 (.0013)	0.13
断奶至开始测试时的 ADG	139	-.006 (.0019)	.0012

CD2/CD16

生长参数	观察数	回归估值 (se)	P 值
开始测试时的 ADG	425	-.572 (.5387)	0.29
从出生至断奶的 ADG	139	-.002 (.0009)	0.011
终生 ADG	425	-.339 (.3598)	0.35
断奶至测试结束时的 ADG	225	-.002 (.0014)	0.096
断奶至开始测试时的 ADG	139	-.006 (.0019)	0.003

CD8

生长参数	观察数	回归估值 (se)	P 值
开始测试时的 ADG	425	-.134 (.3288)	0.68
从出生至断奶的 ADG	139	-.001 (.0006)	0.19
终生 ADG	425	-.068 (.2212)	0.76
断奶至测试结束时的 ADG	225	-.002 (.0008)	0.002
断奶至开始测试时的 ADG	139	-.004 (.0012)	0.0045

上表 5 中重要的是指出如下内容:

这些额外的结果提供了这样的证据, 即 CD16 阳性细胞的百分比与猪的整个生产寿命期间的生长相关($p > 0.09$)。

另外, 这些结果提供了这样的证据, 即 CD2+/CD16+细胞的百分比与生长相关。在这种情况下, 这种相关对于从断奶至测试结束时的 ADG 是显著的($p > 0.096$), 但对终生 ADG 不是必需的。

再者, 这些结果提供了这样的证据, 即 CD8 阳性细胞的百分比与猪的生长相关。在这种情况下, 这种相关对于从断奶至测试结束时的 ADG 是显著的($p > 0.002$), 但对终生 ADG 不是必需的。

参考文献

- Bevan et al., Science 264: 796-7 (1994)。
- Cole et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc. , pp. 77-96 (1985)。
- Dulbecco et al., Virology 8: 396 (1959)。
- Givan et al., J. Immunol. Meth. 230: 99-112 (1999)。
- Haverson et al., Vet. Immunol. Immunopathol. 80: 5-23 (2001)。
- Kohler and Milstein, Nature 256: 495-7 (1975)。
- Kozbor et al., Immunol. Today 4: 72 (1983)。
- Marks et al., J. Biol. Chem. 16007-10 (1992)。
- Mosier, Science 158: 1573-5 (1967)。
- Miedema and Melief, Immunol. Today 6: 258-9 (1983)。
- Robertson, Nature 301: 114 (1983)。
- Saalmueller et al., Vet. Immunol. Immunopathol. 60: 207-28 (1998)。
- Solano-Aguilar et al., J. Immunol. Meth. 241: 185-99 (2000)。
- Solano-Aguilar et al., Int'l. J. Parasitol. 31: 187-95 (2001)。
- Tizard, IMMUNOLOGY: AN INTRODUCTION, Saunders, Philadelphia (1988)。
- Van Diemen et al., submitted to the Journal of Immunology and Immunopathology, 2002。

Zola et al., in MONOCLONAL HYBRIDOMA ANTIBODIES: TECHNIQUES AND APPLICATIONS, Hurell ed., CRC Press, pp. 51-2 (1982)。

本领域技术人员借助于本发明的揭示,可以对本文所述的方法和组合物进行多种改变、以等价物取代或者进行其它变化,以实施本发明。因此,除了如下权利要求书所述的内容之外,本发明的保护范围不被其它内容所限定。

专利名称(译)	用于选择有效动物生长的方法		
公开(公告)号	CN1717586A	公开(公告)日	2006-01-04
申请号	CN03819134.2	申请日	2003-06-20
[标]发明人	卢西纳克琳娜潘托哈 约翰巴斯蒂安森 马莎A 梅林坎普		
发明人	卢西纳·克琳娜 - 潘托哈 约翰·巴斯蒂安森 马莎·A·梅林坎普		
IPC分类号	G01N33/53 A01K A01K1/00 C12Q1/02 C12Q1/06 G01N33/567 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/56977 G01N33/56972		
代理人(译)	林晓红		
优先权	60/390725 2002-06-21 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明一般性涉及动物育种方法。更特别地，本发明涉及基于动物中免疫细胞亚型的数量及淋巴细胞的增殖性应答的频率而在两个或多个动物之中选择健壮性的方法。

表 1: 猪单克隆抗体及 PBMC 中的靶细胞

细胞亚群 (或组合)	单克隆抗体	靶细胞
CD2+/CD16+		表达 CD2 和 CD16 的双阳性淋巴细胞；天然杀伤 (NK) 细胞
CD16	G7	主要由多个细胞亚群: NK、B、巨噬细胞表达的低亲和性受体 FcγRIII
CD2	MSA3	绵羊红细胞受体; 主要在 T 细胞和 NK 细胞上表达, 在 B 细胞上暗淡 (dull)
CD4+/CD8+		表达 CD4 和 CD8 的双阳性 T 淋巴细胞; 正常时暗淡的 CD8
CD4	74-12-4	与抗原呈递细胞 (APC) 上的 MHC II 型抗原和外来抗原反应的 T 淋巴细胞亚群
CD8	76-2-11	与 APC 上的 MHC I 型抗原和外来抗原反应的 T 淋巴细胞亚群