



Udvikling af en sandwich-ELISA til måling af immunglobulin G i minkblod

Mathiesen, Ronja; Chriél, Mariann; Struve, Tina; Heegaard, Peter M. H.

Published in:
Faglig årsberetning 2016 : Kopenhagen Fur

Publication date:
2017

Document Version
Også kaldet Forlagets PDF

[Link back to DTU Orbit](#)

Citation (APA):
Mathiesen, R., Chriél, M., Struve, T., & Heegaard, P. M. H. (2017). Udvikling af en sandwich-ELISA til måling af immunglobulin G i minkblod. I *Faglig årsberetning 2016 : Kopenhagen Fur* (s. 159-162). Kopenhagen Fur.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Udvikling af en sandwich-ELISA til måling af immunglobulin G i minkblod

Ronja Mathiesen¹, Mariann Chriél¹, Tina Struve² & Peter M.H. Heegaard¹

¹DTU Veterinærinstituttet, Bülowsvej 27, 1870 Frederiksberg C

²Kopenhagen Fur, Langagervej 60, 2600 Glostrup

Sammendrag

Forekomst af "fedtede hvalpe" syndromet medfører ekstra håndtering, nedsætter velfærden for minken og øger dødeligheden. En specifik årsag til syndromet er ikke endeligt etableret, men den anses for at være multifaktoriel. Minkhvalpe fødes med meget lave serumkoncentrationer af cirkulerende immunglobuliner (antistoffer). Det er afgørende for hvalpenes modstand mod smitte i deres redemiljø (bakterier og virus), at de hurtigt efter fødslen opnår høje koncentrationer af immunglobulin i blodet. Vi arbejder med en hypotese om at lave immunglobulin serumkoncentrationer øger risikoen for syndromet. Vi beskriver derfor her et sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) til måling af koncentrationen af total immunglobulin G (IgG) i minkblod. ELISA-metoden er blevet valideret med serumprøver fra tæver og deres hvalpe. Metoden er præcis, robust og har en lav detektionsgrænse. Foreløbige resultater antyder at der generelt er større forskel på IgG serumkoncentrationen fra kuld til kuld end blandt hvalpe fra samme kuld. Denne sandwich-ELISA kan senere bruges til at undersøge sammenhængen mellem tævens koncentration af IgG og udviklingen af "fedtede hvalpe"-syndromet i hendes hvalpe.

Mathiesen, R., Chriél, M., Struve, T. & Heegaard, P.M.H. 2017. Udvikling af en sandwich ELISA til måling af immunglobulin G i minkblod. Faglig Årsberetning 2016, 159-162. Kopenhagen Forskning, Agro Food Park 15, DK-8200 Aarhus N, Danmark.

Abstract

The pre-weaning diarrhea syndrome in mink kits results in increased management, reduces the welfare of the mink, and increases mortality. The etiology of the syndrome is considered multifactorial as no specific cause has been established. Mink kits are born with very low concentrations of circulating immunoglobulins, which are important for a good immune system. It is vital for the mink kits to obtain high concentrations of immunoglobulins in the bloodstream ensuring immunity against pathogens found in the environment. In the present project, the hypothesis is that low immunoglobulin serum concentrations are associated with increased disease susceptibility. This study describes a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantification of the concentration of total immunoglobulin G in mink blood. The ELISA was validated with serum samples from females and their kits and was shown to be precise, robust and with a low limit of detection. Preliminary results indicate that IgG serum concentrations among kits from the same litter were more similar than between litters. This sandwich ELISA can later be used to investigate the correlation between the mink dam's IgG concentration and the development of the pre-weaning diarrhea syndrome in her offspring.

Mathiesen, R., Chriél, M., Struve, T. & Heegaard, P.M.H. 2017. Development of a sandwich ELISA to measure IgG in mink blood. Annual Report 2016, 159-162. Kopenhagen Research, Agro Food Park 15, DK-8200 Aarhus N, Denmark.

Keywords: Validation, ELISA, Mink, IgG

Indledning

Tævens immunstatus og betydning for hvalpenes immunitet i relation til "fedtede hvalpe" er ikke tidligere undersøgt i detaljer. En måde at komme tættere på en forståelse af betydningen af tævens immunforsvar og dets effekt på immunforsvaret hos minkhvalpe er at måle den totale immunglobulin G (IgG) koncentration i blodet. Immunforsvaret i den nyfødte mink omfatter cirkulerende immunglobuliner (antistoffer) i blodet, som er overført

under drægtigheden fra mink tæven (transplacental overførsel). Koncentrationen af disse cirkulerende immunglobuliner er dog meget lav i den første tid efter fødslen (Coe og Race 1978). Det må antages at hurtig opnåelse af høje koncentrationer af immunglobulin i blodet er afgørende for en hurtig opbygning af immunitet hos hvalpen og dermed bedre modstandsdygtighed over for infektioner i de første uger efter fødslen.

Da der hverken findes kommercielle antistoffer eller kits til måling af mink IgG var formålet med denne undersøgelse at udvikle og validere en mink IgG-specifik sandwich-ELISA til kvantificering af IgG koncentrationen i minkblod. Sandwich-ELISA'en er baseret på et kommercielt tilgængeligt ged-anti fritte IgG-antistof, som krydsreagerer med IgG fra mink (Martel og Aasted, 2009). Resultaterne viser, at metoden er præcis over et stort koncentrationsområde (god fortyndings-linearitet og god inter- og intra-assay reproducerbarhed) og følsom, med en detektionsgrænse på omkring 4 ng/ml. Foreløbige resultater ved brug af denne metode antyder at serumkoncentrationen af IgG hos mink-hvalpe er kuldspecifik.

Materialer og metoder

Prøveindsamling

Ustabiliserede blodprøver blev taget fra fire minktæver og fire hvalpe fra to farme på Sjælland. Blodet blev centrifugeret ved 4000 G i 15 minutter ved 4 °C og serum blev opsamlet som supernatanten herfra og efterfølgende opbevaret ved -20 °C.

IgG oprensning

IgG blev oprenset ved affinitets-kromatografi fra poollet minkserum, koncentrationsbestemt ved spektrofotometri og brugt som standard. Renhed af IgG blev testet ved SDS-PAGE med sølvfarvning.

Analyse af IgG koncentrationen i mink serum

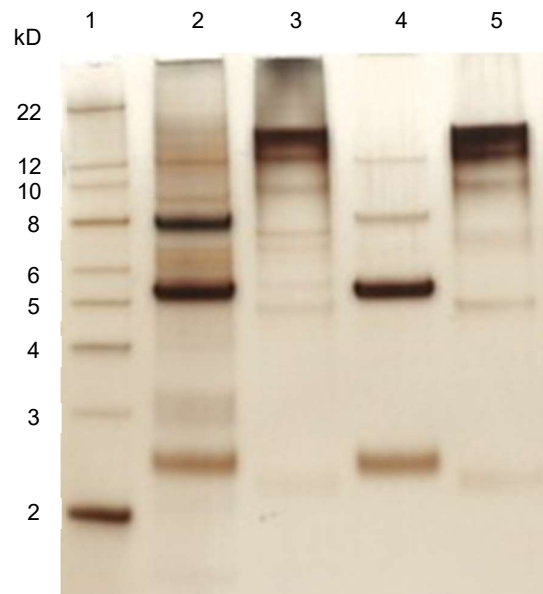
Sandwich-ELISA'en bestod af ged anti-fritte IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, United States) som catching antistof og det SAMME antistof konjugeret med horse radish peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, United States) som detektionsantistof. Hver sandwich-ELISA indeholdt en fortyndingsrække af den oprensede og koncentrationsbestemte IgG, og de ukendte prøvers IgG koncentration blev beregnet herudfra.

Resultater

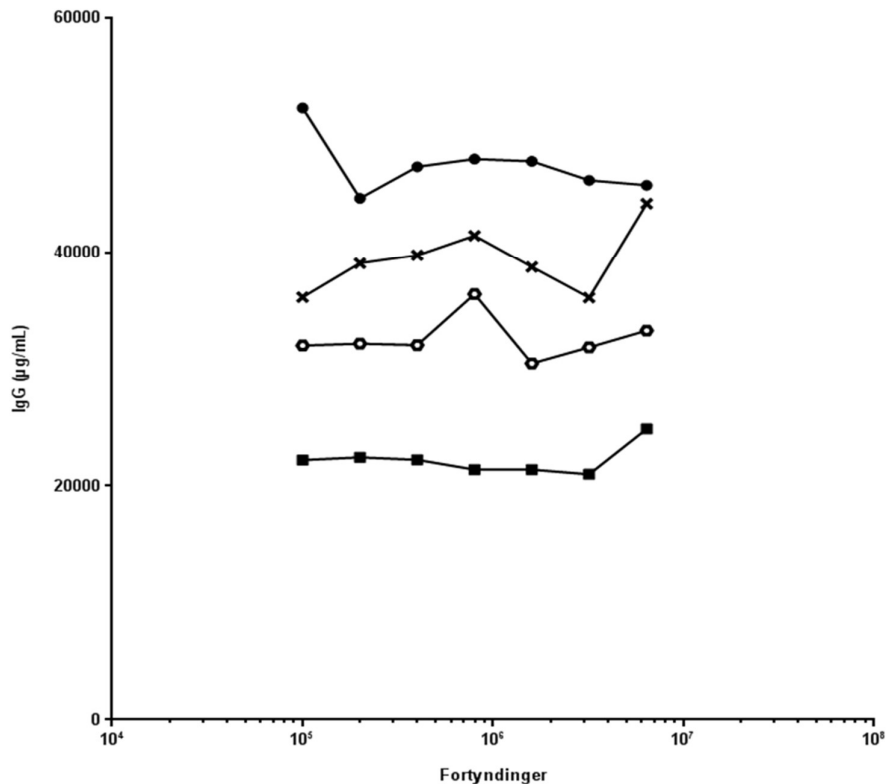
SDS-PAGE analysen viser at det oprensede mink IgG (Figur 1, kolonne 4) består af en tung subunit på ca. 55 kDa og en let subunit på ca. 25 kDa, svarende til hvad der ses for en række andre pattedyr (Janeway *et al.*, 2001).

Linearitet

Fortyndingslineariteten blev undersøgt ved brug af fire forskellige minkserum-prøver. Lineariteten giver oplysninger om præcision af metoden ved forskellige prøvefortyndinger, idet alle fortyndinger af en given blodprøve optimalt skal bestemmes til den samme koncentration, når der beregnes tilbage til den ufortyndede prøve. Afvigelser fra dette kan skyldes at standarden har en anden fortyndingskurve end prøverne. I Figur 2 ses der en fin overensstemmelse ved de fleste fortyndinger.



Figur 3. SDS-polyacrylamid-gelelektroforese (SDS-PAGE) - analyse af oprenset mink IgG i en 12 % NuPAGE Bis-Tris gel under reducerende og ikke-reducerende betingelser og visualiseret ved sølvfarvning. Kolonne 1: molekylvægt markør med molekylvægte angivet til venstre; Kolonne 2: Reduceret mink IgG (leveret af Bent Aasted); Kolonne 3: Ikke-reduceret mink IgG (leveret af Bent Aasted); Kolonne 4: oprenset, elueret mink IgG, reduceret; Kolonne 5: Oprenset, elueret mink IgG, ikke-reduceret.



Figur 2. Lineariteten af sandwich-ELISA demonstreret vha. middelværdierne for fire minktæveblodprøver der blev to-fold fortyndet syv gange. Middelværdierne blev fundet vha. standard kurven.

Detektionsgrænsen

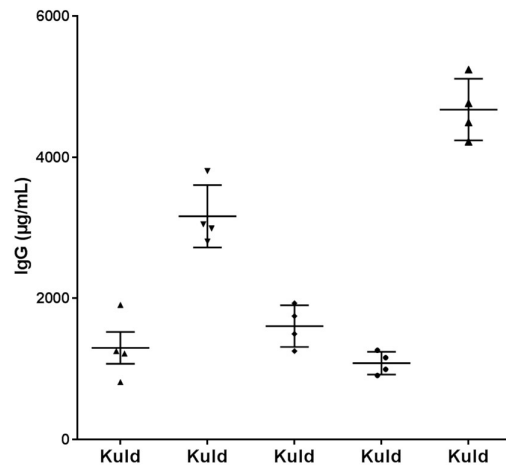
Detektionsgrænsen blev ud fra standardkurven beregnet til 4 ng/mL baseret på middelværdien af baggrunds-signalet + 3*standard afvigelser.

Reproducerbarhed

Intra-assay koefficient af variabilitet (CV) var <10 % CV (n=12) og inter-assay variabiliteten var <15 % CV (n=3) for minkserum-Dprøver med IgG koncentrationer der lå nederst, midt på og højt på standardkurven.

Kuld-effekt af IgG koncentrationen

Fem forskellige kuld med fire hvalpe i hver blev analyseret med den validerede sandwich-ELISA. Som der kan ses fra Figur 3 så er der en klar kuld-effekt på IgG koncentrationen, da man kan se at hver hvalps IgG koncentration ligger indenfor det samme område som de andre hvalpe fra samme kuld.



Figur 3. Et scatter plot der viser hvordan koncentrationen af IgG indenfor samme kuld "klumper sig" omkring det samme IgG koncentrationsområde. Der er forskel på hvalpene fra forskellige kuld. Hver prøve var fortyndet 1:30000 og analyseret i duplikater. Error bars indikerer middel ± SEM (n=4).

Diskussion

Den totale serumkoncentration af IgG kan være en mulig indikator for minkhvalpens immunitet og en ELISA til kvantificering af

IgG i minkblod blev derfor udviklet. Den viste en god linearitet ved forskellige fortyndinger (Figur 2), hvilket medfører en stor fleksibilitet da flere prøver med forskellige koncentrationer kan fortyndes så de falder indenfor standard kurvens detektionsområde. Desuden viste sandwich-ELISA'en god reproducerbarhed i form af lav variabilitet mellem brønde og dage. Resultaterne viste også, at der var en kuldeffekt på serumkoncentrationen af IgG hos hvalpene (Figur 3). Dette er i overensstemmelse med en tidligere undersøgelse, der også konkluderede, at hver minkhvalp indenfor et kuld erhvervede den samme koncentration af IgG fra tæven uanset størrelsen af kullet (Uttenthal *et al.*, 1998).

Konklusion

Sammenfattende blev en sandwich-ELISA til måling af IgG koncentrationen i minkserum udviklet og analytisk valideret. Sandwich-ELISA'en er tilstrækkeligt fleksibel til at bestemme koncentrationen af IgG ved forskellige fortyndinger. Den foreløbige konklusion på analyse af IgG viser, at alle hvalpene i et givet kuld opnår den samme IgG koncentration. Denne ELISA kan potentielt også anvendes til kvantificering af IgG koncentrationer i minkmælk, så man kan undersøge præcis hvor meget tæven leverer og i hvilken grad det evt. hænger sammen med IgG niveauet i hver enkelt hvalp og om det har indflydelse på udviklingen af "fedtede hvalpe" syndromet.

Anerkendelser

En stort tak til avlerne (K. Hansen og P. Hansen) for mink til dette projekt. Henriette Vorsholt takkes for teknisk bistand. Denne undersøgelse blev finansieret af Pelsdyrafgiftsfonden, Danmark 2015 og 2016.

Referencer

Coe, J. E. & Race, R. E. 1978. Ontogeny of Mink IgG, IgA, and IgM (40039). Proceedings of the society for experimental biology and medicine.157, 289-292

Janeway, C.A. Jr, Travers, P, Walport, M. & Shlomchik, M.J. 2001. The structure of a typical antibody molecule. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 2001. 5th edition, Garland Science. New York

Martel, C. J. & Aasted, B. 2009. Characterization of antibodies against ferret immunoglobulins, cytokines and CD markers. Vet Immunol Immunopathol. 2009, 132 (2-4).109-15.

Uttenthal, Å., Henriksen, P., Østergård, J. & Clausen, T. 1998. Measurement of immunoglobulins in Mink. Annual Report 1998 (2nd ed.) 189-196, (119-123), Danish Fur Breeders Research Center, Holstebro, Denmark.