

抗幽门螺杆菌蛋黄免疫球蛋白 IgY 的制备及生物活性的研究^{*}

许春杏¹, 张永宏^{1**}, 陈峥宏², 谢国文¹, 张维森¹, 杨 杰¹, 张 健¹

(1. 贵阳医学院附院 消化内科, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院 微生物学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] 目的: 从免疫了幽门螺杆菌(Hp)抗原的母鸡蛋黄中提取抗 Hp-IgY。方法: 用超声破碎的 Hp 抗原免疫 21 周龄罗曼产蛋母鸡, 取免疫后所产鸡蛋卵黄, 利用水稀释法加硫酸铵盐析方法, 提纯 IgY, ELISA 间接法检测抗体效价, Bradford 法检测抗体蛋白含量, SDS-PAGE 法检测其相对分子质量及纯度。结果: 母鸡初次免疫后第 7 天, 抗体效价即渐渐升高, 约第 45 天达到高峰; 蛋黄抗体经纯化后, 抗 Hp-IgY 蛋白纯度可达 90% 以上, 含量为 6.25 g/L。结论: 用超声破碎的 Hp 抗原免疫母鸡, 盐析法提纯免疫母鸡产蛋黄中的抗 Hp-IgY, 可获得高纯度及高效价的抗 Hp 的特异性蛋黄抗体。

[关键词] 螺杆菌, 幽门; 超声处理; 卵黄; 免疫球蛋白类; 鸡

[中图分类号] R392 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2012)02-0134-03

A Study on Preparation of Anti-helicobacter Pylori Egg Yolk IgY and Its Biological Activity

XU Chunxing¹, ZHANG Yonghong^{1**}, CHEN Zhenghong², XIE Guowen¹,
ZHANG Weisen¹, YANG Jie¹, ZHANG Jian¹

(1. Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China;
2. Department of Microbiology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To extract and purify anti-helicobacter pylori IgY from egg yolk of hens immunized by Helicobacter pylori (HP). **Methods:** HP antigen subjected to ultrasonication was used to immune 21 weeks old Roman egg production hens. IgY in immunized yolk was isolated by water dilution method combined with ammonium sulfate salting out method. Its titer was detected by indirect ELISA. The protein amount was measured with Bradford method. The purity and molecular weight of IgY were measured with SDS-PAGE method. **Results:** Seven days after the first immunization, the IgY titer gradually increased, and reached the peak on the 45th days. After purification, the purity of IgY was more than 90%, and the protein content was 6.25 g/L. **Conclusions:** In this way, anti-HP IgY with high purity and titer has been prepared.

[Key words] Helicobacter pylori (HP); sonication; yolk; immunoglobulins; chickens

幽门螺杆菌(Hp)是一种引起人类消化道疾病的重要病原菌,近几年来,Hp 对抗生素的耐药性显著提高,Hp 的根除率下降,对 Hp 的预防与治疗已引起国内外学者的高度关注。从鸡卵中获得的抗体 IgY 具有一些不同于 IgG 的生物学特性, IgY 对

热、酸均有很强的耐受性,稳定性很好,并且制备简单,来源方便^[1]。卵黄抗体(IgY)已被广泛地用于食品或饲料的添加剂、防腐剂、人和动物疾病诊断试剂,以及用于人和动物的疾病治疗等^[2]。Mine 等^[3]认为口服特异性 IgY 抗体的被动免疫替代抗

^{*}[基金项目] 贵州省科学技术基金项目[黔科合 J 字 (2005)2121 号]。

^{**} 通讯作者 E-mail:zyh20103026@163.com

生素,可以成功地治疗许多胃肠道疾病。Shin J H^[4]认为 IgY 对实验动物确有被动免疫保护作用,并指出 IgY 对提高人体对胃肠道疾病的抵抗力具有十分积极的作用,在免疫学研究和疾病的检测诊断、治疗中具有很好的应用前景。本研究从鸡蛋中制备了高纯度及高效价的抗幽门螺杆菌的特异性蛋黄抗体 IgY。

1 材料与方法

1.1 材料 HP 菌株 SS1 由中国疾病预防控制中心惠赠,哥伦比亚琼脂购自 CM0331B 英国 OX-OID 公司,2.5% 幽门螺杆菌选择添加剂购自青岛高科园海博生物技术有限公司,Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究,弗氏完全佐剂及不完全弗氏佐剂均购自 SIGMA。鸡幽门螺旋菌 IgG (Hp-IgG) 酶联免疫分析试剂盒(RND 分装)、鸡卵黄抗体(IGY)酶联免疫分析试剂盒(RND 分装)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒及蛋白分子量标准,均由碧云天生物技术研究所提供。

1.2 Hp 的培养及 Hp 抗原的制备 取 Hp 菌株 SS1 划线接种于哥伦比亚琼脂培养基(8% 脱纤维绵羊血 2.5% 幽门螺杆菌选择添加剂),置 37 °C 微需氧环境中培养。无菌生理盐水洗下 Hp 标准菌株 SS1 培养物,在冰浴下超声破碎菌体后,再以 12 000 r/min 4 °C 离心 30 min,取上清液,冻于 -20 °C 保存。采用 Bradford 方法测定其蛋白浓度,按照参考文献[5]及说明书方法测定。

1.3 母鸡处理及鸡血清抗 HP-IgG 效价测定 2 只罗曼鸡进行免疫,免疫前 7 d 采蛋,作为阴性对照。第 1 次免疫:将超声破碎蛋白抗原约 500 μg,加完全弗氏佐剂充分乳化后,颈背部皮下多点免疫第一针;首次免疫后第 10、20、27 天分别进行第 2、3、4 次免疫,均以超声破碎抗原约 300 μg,加不完全弗氏佐剂充分乳化后,颈背部皮下多点注射免疫。免疫前第 7 天及免疫第 3 天后于鸡翼静脉处采血 0.5 ~ 1 ml 并分离血清。用 ELISA 法测鸡血清抗 Hp-IgG 效价。取免疫前第 7 天鸡血清的 IgG 平均 OD450 值为 N,免疫后鸡血清抗 Hp-IgG 平均 OD450 值为 P,计算 $P/N = \text{待测孔 OD 值} / \text{阴性对照孔 OD 值}$, P/N 大于或等于 2.1 为阳性,小于 1.5 为阴性,介于二者之间为可疑阳性。

1.4 IgY 的提取与纯化 当血清抗 Hp-IgG 效价升高后开始收蛋,共 60 d。采用水稀释法 + 硫酸铵

沉淀方法提取与纯化 IgY^[6]。10 倍双蒸水稀释卵黄,按 19% ~ 14% 分级盐析沉淀方法,获沉淀溶于 15 ml PBS 中,将其置于 ddH₂O 中透析过夜后,再以 0.22 μm 滤器过滤灭菌,获得 IgY, -20 °C 保存。IgY 蛋白浓度测定用 Bradford 方法,方法同测定 Hp 抗原蛋白浓度。

1.5 IgY 分子质量及蛋白纯度测定 SDS-PAGE 方法^[5]测定(提取自免疫第 45 天后鸡蛋的 Hp-IgY)蛋白质分子质量及蛋白纯度,分离胶和浓缩胶的浓度分别为 12% 和 5%,用 BandScan 软件分析蛋白纯度。

1.6 鸡卵黄抗 Hp-IgY 效价测定 建立间接 ELISA 法,将抗 Hp-IgY 抗体稀释不同浓度,辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgY 为二抗,用酶稀释液稀释酶二抗,最佳稀释浓度为 1:5 000,按照说明书,用已建立的检测 IgY 的 ELISA 法测定纯化的 Hp-IgY 的效价。取免疫前 7 d 鸡蛋的 IgY 平均 OD450 值为 N,免疫后鸡蛋的抗 Hp-IgY 平均 OD450 值为 P,计算 P/N 值,按 1.3 项下方法判定结果。

2 结果

2.1 免疫鸡的血清抗 Hp-IgG 效价 免疫前 7 d, IgG 平均 OD450 值(N)为 0.121。按 P/N 大于或等于 2.1 为阳性,即 OD 大于或等于 0.254 1 为阳性。在初次免疫后第 3 d,鸡血清抗 HP-IgG 开始增高;在第 16 d 达最高,于第 5、6 周分别出现第 2、3 个峰值,以后持续维持在较高水平,首次免疫 120 d 后,抗体效价已呈明显下降趋势。

2.2 Hp 抗原和抗 Hp-IgY 蛋白浓度 用 Bradford 方法测得抗原浓度为 1.0 g/L;提纯的抗 Hp-IgY 蛋白浓度为 6.25 g/L。

2.3 抗 Hp-IgY 蛋白质分子质量及纯度 从图 1 可见,提纯的 IgY 有两条带,分子量分别为 65 kD、25 kD, BandScan 凝胶图像分析软件分析其纯度达 90%。

2.4 鸡卵黄抗 Hp-IgY 效价 免疫前 7 d, IgY 平均 OD450 值(N)为 0.131。按 P/N 大于或等于 2.1 为阳性,即 OD 大于或等于 0.275 1 为阳性。抗 Hp-IgY 在首次免疫 7 d 后即可产生,效价逐渐上升,在初免后第 45 天左右达到高峰,效价为 1:12 800,此后维持较高水平,在此水平上维持达 60 d 以上(效价大于 1:10 000),然后抗体效价呈缓慢下降趋势。见图 2。

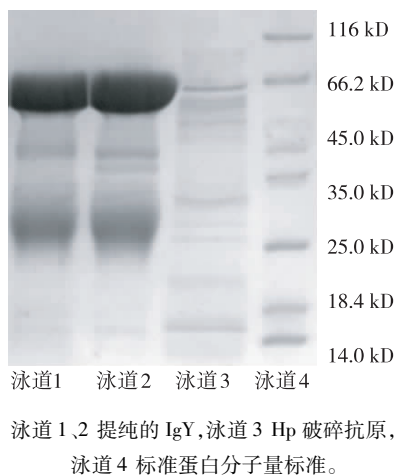


图1 抗 Hp-IgY 电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of anti-Hp IgY

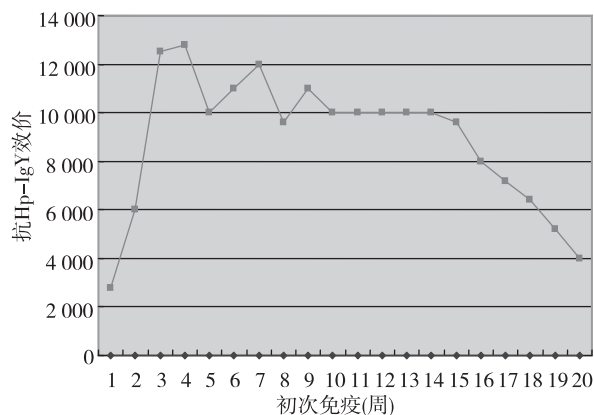


图2 鸡卵黄抗体 IgY 效价

Fig. 2 The regularity of egg yolk IgY titer changing with weeks

3 讨论

幽门螺杆菌(Hp)是一种引起人类消化道疾病的重要病原菌,与人类胃炎、胃及十二指肠溃疡、胃腺癌和胃黏膜相关性淋巴瘤组织恶性淋巴瘤密切相关。我国普通人群 Hp 感染率为 50% ~ 60%,并且每年传播速度渐增。近几年来 Hp 对抗生素的耐药性显著提高,根除率显著下降^[7]。因此寻找一种治疗和预防 Hp 感染而没有耐药性的新方法显得尤为重要。

近年来,鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 由于其来源丰富制备便宜,具有热稳定性,耐酸和耐胃酸酶等特点而被作为口服抗体或添加到强化食品中,用来预防和控制肠道和口腔细菌如大肠杆菌、变形链球菌等感染^[2]。这些研究为制备 Hp 的特异性 IgY 抗

体(Hp-IgY)提供了可能,并为预防和治疗 Hp 相关性疾病开辟了一条新途径。抗 Hp-IgY 有一定的耐酶性,以被动免疫的方式口服进入消化道后,在消化道与 Hp 发生抗原抗体反应,从而保护机体,适合作为口服生物免疫制剂,用于预防或治疗 Hp 感染。IgY 的免疫方法有很多,抗原物质口服后,一般多会被消化道的各种分解酶所降解破坏,不能作为有效抗原而进入体内。免疫动物或预防接种多选用皮下、肌肉、静脉、腹腔途径注射抗原等。有研究证明黏膜外途径如皮下免疫能够诱导保护性免疫反应^[8]。因此本实验采用皮下多点注射抗原取得免疫成功。

从卵黄中提取分离 IgY 常用的方法有聚乙二醇、硫酸葡聚糖、有机溶剂、水稀释法、缓冲液提取法等^[9]。本实验采用水稀释法 + 硫酸铵沉淀方法^[10],取代以往常用的饱和硫酸铵方法^[11],不仅节省了试剂用量,并且获得了高纯度的 IgY,但本实验提取的 IgY 浓度为 6.25 g/L,如何提高其浓度尚需进一步研究。

IgY 由 2 条重链和 2 条轻链组成,相对分子量分别为 22 000 ~ 30 000 和 67 000 ~ 70 000,本实验用 SDS-PAGE 方法分析,提纯的 IgY 有两条带,分子量分别为 65 kD、25 kD,两条带总和与分子量为 180 kD 相符。

本实验中,IgY 抗体在首次免疫后第 45 天左右即达到高峰,经二免和三免后,高效价维持 60 d 以上,这与文献报道的特异性 IgY 产生和到达高峰的时间以及维持 IgY 高效价的规律相同。因此,最好在首次免疫后 30 ~ 90 d 收集鸡蛋,即可保证制备的卵黄抗体有足够的效价。

IgY 抗体不仅安全性好,而且鸡蛋来源丰富、抗体含量高、稳定性好、提取方法简便,作为口服药物防治 HP 感染将具有广阔的前景。本实验成功制备了高纯度、高效价的特异性 IgY,为进一步制备抗 HP 感染的口服制剂和食品添加剂奠定了基础。

4 参考文献

- [1] Lise Svendsen ,Annette Crowley, Ostergaard LH ,et al . Development and comparision of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk[J]. J Laboratory Animal Science ,1995(1) :89 - 93.

(下转第 140 页)

多^[9,10],常见的方法有水煎煮法、乙醇回流法、索氏提取法、超声提取法,本研究按这些方法提取淫羊藿总黄酮,再经大孔吸附树脂柱分离,得到淫羊藿总黄酮的含量相差不大,虽然以 60% 乙醇为溶媒时提取的淫羊藿总黄酮含量较高,但含量均低于 50%。为提高淫羊藿总黄酮的含量,考虑到水具有廉价环保等特点,实验时采用水提,过大孔吸附树脂柱分离后,再用乙酸乙酯、正丁醇进行萃取的方法,对提取物进行了精制。结果发现,经萃取后所得淫羊藿总黄酮的含量提高到 61%,表明,大孔吸附树脂柱分离法和萃取法相结合可以达到纯化淫羊藿总黄酮的目的。

预实验结果表明,加水量为药材质量的 23 倍时才能将药材很好的浸泡;用 30 倍量的水煎煮药材 3 次,每次 1 h,几乎可将药材中总黄酮完全提出。在浸泡时间、煎煮时间相同的条件下,加入 27 倍量、30 倍量水,所得总黄酮提取物的浸膏得率和总黄酮含量变化均小于 5%。由于水浴挥发所需时间较长,为减少提取液的浓缩时间,故选择 27 倍量水。

4 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:306-308.
- [2] 任红. 淫羊藿总黄酮的药理学研究[J]. 医学信息, 2011(1):299-301.
- [3] 王静,李建平,张跃文,等. 淫羊藿药理学研究进展[J]. 中国药业,2009(8):60-61.
- [4] 钟华林. 正交设计优选痛经丸提取工艺条件的研究[J]. 中成药,2008(5):773-774.
- [5] 陈肖家,张庆文,季晖. 紫外分光光度法和高效液相色谱法测定淫羊藿总黄酮含量的比较研究[J]. 药物分析杂志,2007(5):625-629.
- [6] 马轶,孟宪生,包永睿. 大孔吸附树脂对淫羊藿中总黄酮及淫羊藿苷吸附纯化的研究[J]. 亚太传统医药, 2009(9):48-50.
- [7] 李冬梅,张新春,尹晓飞. 大孔吸附树脂对淫羊藿总黄酮的吸附性能研究[J]. 中国医院药学杂志, 2006(8):943-945.
- [8] 李冬梅,尹晓飞,蔡大伟. AB-8 大孔吸附树脂分离纯化淫羊藿总黄酮的研究[J]. 中国药师,2006(12):1109-1111.
- [9] 余晓辉,赵磊,侯嘉,等. 不同提取方法对淫羊藿中总黄酮提取率的比较[J]. 中成药,2011(7):1257-1259.
- [10] 刘敏,周芳,黄少伟,等. 淫羊藿总黄酮的提取工艺及含量分布[J]. 时珍国医国药,2007(1):31-33.
- (2011-11-16 收稿,2011-12-26 修回)
- 编辑:余 堃
- (上接第 136 页)
- [2] 邓慧君,曹进. 茶及茶多酚类化合物对血脂水平的影响[J]. 国外医学(药理分册),2004(3):101-139.
- [3] Mine Y, Kovacs. Nolan egg yolk antibodies as therapeutics In enteric infectious disease: a review[J]. J Med Food, 2002(3):159-169.
- [4] Shin Ji-Hyun, Mierha Yand, Seung Woo Nam, et al. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of Helicobacter pylori infection[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002(5):1061-1066.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1992:880-887.
- [6] Akita EM, Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs Laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. coli strain[J]. J Immunol Methods, 1993(2):207-214.
- [7] De Francosov. Margiotto M, Zullo AJ, et al. Prevalence of primary clarithromycin resistance in Helicobacter pylori strains over a 15 year period in Italy. J. Antimicrob Chemother, 2007(59):783-785.
- [8] 史彤,刘文忠. 幽门螺杆菌疫苗免疫保护机制及其研究进展[J]. 胃肠病学,2002(7):45-49.
- [9] 陈继英,郭嘉林,张存彦,等. 茶多酚的研究进展[J]. 中草药,2004(10):11-13.
- [10] Akita EM, Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. coli strain[J]. J Immunol Methods, 1993(2):207-214.
- [11] Ruan GP, Ma L, He WX, et al. Efficient production, purification, and application of egg yolk antibodies against human HLA-A*0201 heavy chain and light chain (beta2m)[J]. Protein Expr Purif, 2005(1):45-51.
- (2011-12-20 收稿,2012-02-27 修回)
- 编辑:周 凌