

酶联免疫吸附技术测定鸡蛋黄中抗幽门螺杆菌 IgY 活性

周力, 刘灏, 张永宏, 左丽, 陈阿英, 李永念

周力, 刘灏, 张永宏, 贵州省贵阳医学院附属医院消化内科
贵州省贵阳市 550004
左丽, 陈阿英, 李永念, 贵州省贵阳医学院免疫学教研室
贵州省贵阳市 550001
贵州省省长基金课题资助项目, No. S2001.23
项目负责人: 张永宏, 550004, 贵州省贵阳医学院附属医院消化内科.
电话: 0851-6855119-8818
收稿日期: 2004-07-20 接受日期: 2004-09-04

摘要

目的: 探索测定抗 *H pylori*-IgY 的方法.

方法: 用间接ELISA法测定幽门螺旋杆菌(*H pylori*)超声破碎物免疫鸡所产鸡蛋中抗 *H pylori*-IgY 的效价. 用间接ELISA法检测抗 *H pylori*-IgY 的酸碱及酶稳定性.

结果: 用幽门螺旋杆菌的超声破碎物免疫产蛋母鸡, 可得到高效价的抗幽门螺旋杆菌 IgY. IgY 的酸稳定性好, 耐胃蛋白酶.

结论: 间接ELISA法简单、准确, 可作为测定 IgY 的标准方法.

周力, 刘灏, 张永宏, 左丽, 陈阿英, 李永念. 酶联免疫吸附技术测定鸡蛋黄中抗幽门螺杆菌 IgY 活性. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2874-2876
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2874.asp>

0 引言

哺乳动物的蛋白刺激鸡产生抗体远比家兔容易^[1-3]. 鸡免疫后产生的抗体经血清进入蛋黄, 从蛋黄中能获得大量高质量的特异性免疫球蛋白, 称为 IgY^[4]. IgY 不仅分子质量和等电点不同于哺乳动物的 IgG^[5], 而且不与哺乳动物的血清补体和 Fc 端结合^[6], 不受类风湿因子的干扰, 不被葡萄球菌 A 蛋白和 G 蛋白识别; 因而, 将 IgY 运用于生物化学和免疫学的基础研究及医学临床检测诊断中具有许多优越性^[7-8]. 为了生产鸡的特异性 IgY, 须用免疫学方法检测鸡蛋黄中特异性 IgY 的效价, 以确定免疫效果、设计免疫方法. 我们采用 ELISA 测定免疫鸡蛋黄中特异性抗体的效价. 以免疫鸡血清 A_{490} 值(P A_{490} 值)和阴性对照鸡血清的 A_{490} 值(N A_{490} 值)之比值, 作为一抗和二抗最适工作浓度的选择标准.

1 材料和方法

1.1 材料 动物: 17周龄的罗曼免疫产蛋母鸡. *H pylori* 菌株 NCTC11637、NCTC11639、SS1 由中国预防科学院流行病学研究所和贵阳医学院免疫教研室提供, 其余 22 株由贵阳医学院附属医院临床患者分离. 全部根据细菌学和 PCR 鉴定(PCR 试剂盒由华美生物制品公司提

供)为 *H pylori*, 且所有菌株均为 VacA 基因阳性.

1.2 方法 抗原的制备: 参照相关文献[9], 超声破碎 *H pylori*. 健康罗曼免疫蛋鸡 4 只(17 周龄大小, 每只重约 1.5 kg), 随机分成两组, 一组免疫, 另一组作对照. 免疫组每只鸡初次注射 500 μ g 抗原. 首次免疫后的 7, 14, 21, 28 d 各用 250 μ g 抗原注射, 20 wk 加强免疫. 免疫前 2 d 开始收集鸡蛋和采鸡血测抗体. 对照组用不含抗原的成分注射. 抗 *H pylori*-IgY 的分离提取: 用水稀释-硫酸铵沉淀法^[10]提取抗 *H pylori*-IgY, -80 $^{\circ}$ C 保存. 测定鸡蛋黄抗 *H pylori*-IgY 的 ELISA 方法.

1.2.1 间接 ELISA 法 用包被液稀释抗原, 以 2 μ g/孔包被 96 孔板 4 $^{\circ}$ C, 18-24 h 以上. PBS-Tween20(Tween-20, pH7.4, 0.01 mol/L PBS)洗涤 3 次, 每次 3 min; 每孔加入 200 μ L 0.5 g/L 封闭液(pH7.4 PBS-Tween20 缓冲液, 含 10 g/L 小牛血清白蛋白), 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 洗涤同前; 加入待测 IgY 稀释液 100 μ L/孔, 封盖后 37 $^{\circ}$ C 温浴 1 h, 洗涤同前; 加入辣根过氧化物酶标记的兔抗鸡 IgY(浓度 1:100)100 μ L/孔, 封盖后 37 $^{\circ}$ C 温浴 1 h, 洗涤同前; 显色液显色 20 min 后, 滴 0.1 mol/L 的 H_2SO_4 终止反应后, 用酶标仪上在 490 nm 比色, 测定其吸光度值(A_{490}). 一抗(鸡抗 *H pylori*-IgY)和二抗(鼠抗鸡 IgY)最适工作浓度的确定: 用幽门螺旋杆菌超声破碎物抗原以及免疫鸡蛋黄 IgY 和阴性对照鸡 IgY 来选择最适工作浓度. 将免疫鸡血清和阴性对照鸡血清分别以 1:100 倍比稀释至 1:1 600, 二抗以 1:100 倍比稀释至 1:400 进行 ELISA 法测定. 以免疫鸡血清 A_{490} 值(P A_{490} 值)和阴性对照鸡血清的 A_{490} 值(N A_{490} 值)之比值, 作为一抗和二抗最适工作浓度的选择标准.

1.2.2 IgY 对酶和酸的耐受性 (1)胃蛋白酶消化试验: 在不同 pH 的抗 *H pylori*-IgY 溶液中, 加入 1%(E/S)胃蛋白酶(活性 1:3 000), 37 $^{\circ}$ C 水浴 0, 1, 2, 3, 4 h 中和酸使酶失活. 测 A_{490} 值. (2)胰蛋白酶消化试验: 在 pH8.0 的抗 *H pylori*-IgY 溶液中, 加入 1%(E/S)胰蛋白酶(活性 1:250), 37 $^{\circ}$ C 水浴数小时. 测 A_{490} 值. (3)抗 *H pylori*-IgY 对酸的耐受性: 在不同 pH 值 37 $^{\circ}$ C 下, 水浴抗 *H pylori*-IgY 2 h, 中和酸, 测 IgY 的 A_{490} 值.

统计学处理 P/N 比值公式及判断: P/N 值 = (待测孔 A 值 - 空白孔 A 值) \div (阴性对照孔 A 值 - 空白孔 A 值). P/N \geq 2.1 为阳性, 1.5 < P/N \leq 2.1 为可疑, 1.5 < P/N 为阴性.

2 结果

各空白孔 A_{490} 值均为 0. Anti-*H pylori*-IgY A_{490} 值的最小

值为0.1048, $P/N=1.048 \div 0.0413 \approx 2.54 > 2.1$, 为阳性; 因此, 实验所得的 Anti-*H pylori*-IgY A_{490} 值均为阳性. *t* 检验分析 Anti-*H pylori*-IgY A_{490} 值, $P < 0.05$, 免疫组和对照组差异有显著性, 有统计学意义.

一抗稀释度 1:100, 二抗稀释度 1:400 时, $P/N = 12.4914$, 最大; 其次, 一抗稀释度 1:200, 二抗稀释度 1:400 时, $P/N = 12.1767$; 再次, 一抗稀释度 1:100, 二抗稀释度 1:200 时, $P/N = 12.148$. 这三者的 P/N 值都大于 2.1 且显著高于其他组. 当二抗稀释度固定、一抗稀释度变化时, 二抗稀释度为 1:200 的各组 P/N 值相差最大. 当抗原每孔包被 1 μg , 一抗以 1:100 稀释, 二抗以 1:200 稀释时, 高免鸡蛋黄 IgY 的 A_{490} 值 ($P A_{490}$ 值) 为 0.5017, 阴性对照鸡蛋黄 IgY 的 A_{490} 值 ($P A_{490}$ 值) 为 0.0413, 二者差异显著, $P/N = 12.148$, 具有很高的灵敏度, 有利于抗体活性的测定. 因此, 一抗的最适工作浓度选择 1:100 稀释, 二抗选 1:200 稀释. 幽门螺杆菌超声破碎物抗原初免疫母鸡后第 9 d, 蛋中抗 *H pylori*-IgY 开始测出, 并持续增高; 3-4 wk 达高峰; 之后效价维持在较高水平; 在 12-14 wk 和 20-24 wk 左右又分别出现一次高峰, 抗体活性持续 25 wk 以上(图 1). pH 2-6 范围内, 随 pH 值增大, 胃蛋白酶对抗 *H pylori*-IgY 活性的影响逐渐减小. pH = 6 时, 胃蛋白酶对抗 *H pylori*-IgY 的活性几乎无影响; pH = 2 时, 胃蛋白酶对抗 *H pylori*-IgY 的活性影响最大(图 2). 抗 *H pylori*-IgY 对胰蛋白酶极其敏感. 在胰蛋白酶作用的

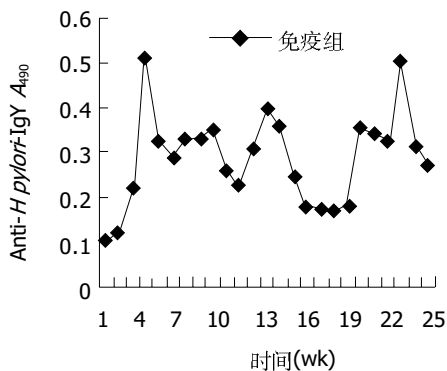


图1 免疫母鸡抗-*H pylori*-IgY A_{490} 值变化规律.

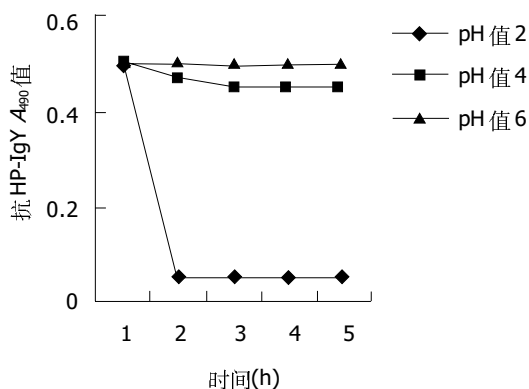


图2 不同 pH 值下胃蛋白酶对 Anti-*H pylori*-IgY A_{490} 的影响.

最初 1 h 内, 抗 *H pylori*-IgY 的抗原结合活性就几乎完全丧失. pH 值在 4-7 之间时, 抗 *H pylori*-IgY 的活性几乎不受 pH 值影响. pH 值在 7-8 之间时, 抗 *H pylori*-IgY 活性略微下降, 降低值不超过 10%; pH < 4 时, 抗 *H pylori*-IgY 活性开始急剧下降, pH = 4 时, 抗 *H pylori*-IgY 活性下降约 70%; pH = 3 时, 抗 *H pylori*-IgY 活性下降约 80%; pH = 2 时, 抗 *H pylori*-IgY 接近失活(图 3).

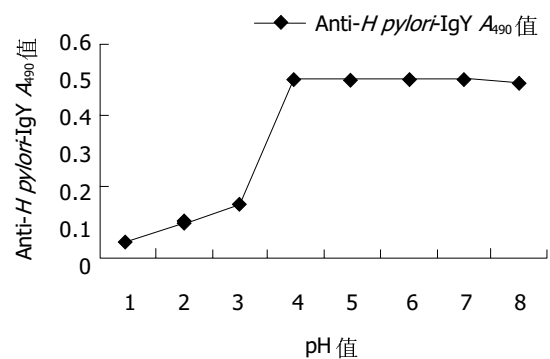


图3 Anti-*H pylori*-IgY 的对酶的耐受性.

3 讨论

目前检测鸡蛋黄 IgY 的常用方法有免疫双向扩散法和血凝抑制法等, 其灵敏度都不够高, 且不易进行标准化测量. 本试验用幽门螺杆菌超声破碎物抗原包被板、鼠抗鸡 IgY 作二抗, 以间接 ELISA 法测定鸡蛋黄中抗 *H pylori*-IgY 的效价, 并以此监测其变化规律. 鸡蛋黄中, 抗 *H pylori*-IgY 抗体含量高; 间接 ELISA 法检测发现, 抗 *H pylori*-IgY 能长时间地维持在较高水平, 这十分有利于工业化生产, 为研究和利用 IgY 提供了高灵敏度和简便易行的标准化方法, 为进一步的动物和临床研究奠定了基础.

抗 *H pylori*-IgY 的酸稳定性实验提示: 降低胃酸的药物(如 H₂-受体阻止剂和质子泵抑制剂)有利于维持抗 *H pylori*-IgY 的活性; 二者合用, 将提高 *H pylori* 的根除率. 抗 *H pylori*-IgY 的酶稳定性实验提示: (1) 与抑制胃酸分泌药物合用, 可保护抗 *H pylori*-IgY 免受胃蛋白酶水解破坏. (2) 抗 *H pylori*-IgY 不耐受胰蛋白酶. 在有胆汁反流的患者, 胰蛋白酶可随之反流入胃; 这类患者应注意加用黏附胆汁的药物, 以保护抗 *H pylori*-IgY 的活性.

近年来, 将 IgY 用于预防与治疗人和动物的某些疾病的报道较多见^[11-13], 证实了 IgY 的被动免疫保护作用, 并提示特异性鸡蛋黄抗体 IgY 对病原体感染的防御没有动物种属的差异, 这就为 IgY 防治人类疾病的应用奠定了基础. IgY 可作为一种食品级抗体, 应用于婴幼儿肠道感染; 可作为一种食品添加剂, 应用于某些胃肠炎的口服被动性免疫预防. 口服卵黄或 IgY 可获得被动免疫保护, 可应用 IgY 预防婴幼儿和家畜(禽)的各种微生物感染肠道疾病. 对于患有免疫缺陷性疾病的人口

服IgY预防肠道感染更有其独特的功能.因此,IgY可作为食品公司的免疫型强化剂.有人提出给小于5月龄的婴儿及先天性免疫缺陷患儿口服含有高滴度抗病毒活性的IgY用于疾病的防治,对那些不能以母乳喂养的儿童尤为有意义^[14].

4 参考文献

- 1 Carroll S B, Stollar BD. Antibodies to calf thymus RNA polymerase II from egg yolks of immunized hens. *J Biol Chem* 1983;258:24-29
- 2 Song CS, Yu JH, Bai DH, Hester PY, Kim KH. Antibodies to the α -subunit of insulin receptor from eggs of immunized hens. *J Immunol* 1985;135:3354-3361
- 3 Rose ME, Or lane E. Buttres. Immunoglobulin classes in the haes egg: their segregation in yolk and white. *Eur. J Immunol* 1974;4:521
- 4 Jensenius JC, Andersen I, Hau J, Crone M, Koch C. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG. *J Immunol Methods* 1981;46:63-67
- 5 Toivanen PA. Immunology: basis and practice. Boca Raton FL USA. CRC press 1987:113-121
- 6 Benson HN, Brumfield HP, Pomeroy BS. Requirement of avian C' 1 for fixation of guinea pig complement by avian antibody-antigen complexes. *J Immunol* 1961;87:616-621
- 7 Kronvall G, Seal US, Svensson S, Willams PC. Phylogenetic insight into evolution of mammalian Fc fragment of IgG globulin using Staphylococcal protein A. *J Immunol* 1990;104:140-146
- 8 Kronvall G, Seal US, Finstad J. Phylogenetic protein A-reactive serum globulins in birds and mammals. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect* 1974;82:12-18
- 9 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺旋杆菌感染的基础与临床. 中国科学技术出版社, 2002:58-122
- 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 Immunol Meth* 1993;160:207-214
- 11 Ebina T, Tskada K, Umezu K, Xose M, Tsuda K, Hatta H, Kim M, Yamamoto T. Gastroenteritis in sucking mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin(IgY) and treated with a protein bond polysaccharide Preparation(PSK). *Microbiol Immunol* 1990;34:617-629
- 12 Hiraga C, Kodama Y, Sugiyam T. Prevention of HTB in fection with chicken egg yolk immunoglobulins containing rotavirus antibody in cat. *Kansenshogaka Zasshi* 1990;64:118
- 13 Yokoyama H, Peralta RC, Diaz R, Sento S, Ikemori Y, Kodama Y. Passive protection effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic Eschichia coli infection in neonatal piglets. *Infect Immun* 1992;60:998-1007
- 14 Schimizu M, Fitisimmons RC, Nakai S. Anti-E. coli immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J Food Sci* 1988;53:1360

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

基因表达谱芯片技术筛选 TAHCCP1 转染细胞差异表达基因

刘妍, 成军, 纪冬, 王建军

刘妍, 成军, 纪冬, 王建军, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心、全军病毒性肝炎防治研究重点实验室 北京市100039
国家自然科学基金攻关项目, No. C030114020, No. C30070689, No. 30371288
军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
北京市自然科学基金面上项目, No. 5042024
项目负责人: 成军, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所基因治疗研究中心, 全军病毒性肝炎防治研究重点实验室. cj@genetherapy.com.cn
电话: 010-6693-3391 传真: 010-6380-1283
收稿日期: 2004-05-28 接受日期: 2004-09-30

摘要

目的: 应用基因芯片技术, 检测丙型肝炎病毒(HCV)核心蛋白反式激活基因TAHCCP1的表达对肝母细胞瘤细胞系HepG2基因表达谱的影响, 进一步阐明TAHCCP1在肝细胞中上调或下调的基因, 探索其可能的调节功能.

方法: 设计并合成TAHCCP1基因序列特异性的引物, 应用聚合酶链反应(PCR)技术扩增TAHCCP1基因片段, 以常规的分子生物学技术将获得的TAHCCP1编码基因片段克隆到

TA载体中进行核苷酸序列的测定, 构建真核表达载体pcDNA3.1(-)-TAHCCP1, 转染肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)为平行对照, 制备转染后的细胞裂解液, 提取mRNA, 逆转录为cDNA, 应用基因表达谱芯片技术对两组间差异表达mRNA进行检测和分析.

结果: 在筛选的1152点cDNA芯片中, 有110种基因的表达水平上调(占9.55%), 98种基因的表达水平下调(8.51%), 包括一些与体内免疫调节、脂类代谢、蛋白质的翻译合成、氧化反应、细胞凋亡及细胞内的信号传导方面的基因.

结论: 应用基因表达谱芯片成功筛选了TAHCCP1转染细胞后差异表达基因, 为进一步阐明TAHCCP1蛋白可能的生物学功能提供依据.

刘妍, 成军, 纪冬, 王建军. 基因表达谱芯片技术筛选TAHCCP1转染细胞差异表达基因. 世界华人消化杂志 2004;12(12):2876-2880
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2876.asp>