抗大肠杆菌免疫卵黄抗体制备工艺的研究

黄秀锦，谭佩毅
（江苏食品职业技术学院，江苏淮安 223003）

摘要：以猪源致病性大肠杆菌为抗原，免疫蛋鸡获取富含 IgY 的免疫鸡蛋，探讨抗原剂量、免疫部位、佐剂种类和免疫间隔等因素对 IgY 含量的影响，并通过正交实验对免疫条件进行了优化。通过单因素和正交实验确定最佳免疫条件为：抗原剂量 2×10^8 cfu/mL、佐剂为 IFA、胸部肌肉注射免疫、强化免疫间隔方案为第 3、5 周，此条件下 IgY 总量达到 5.532 g；各因素对 IgY 总量的影响依次为：免疫间隔>抗原剂量>免疫部位>佐剂种类。

关键词：卵黄抗体；大肠杆菌；制备

文章篇号：1673-9078(2013)1-153-157

Study of Preparation of Yolk Immunoglobulin against *Escherichia Coli*

HUANG Xiu-Jin, TAN Pei-Yi
(Jiangsu Food Science College, Huaian 223003, China)

Abstract: High-containing yolk immunoglobulin eggs were prepared by hens with *Escherichia coli* as antigens. The effects of four reaction parameters, including antigen dosage, immunite position, adjuvants and immune time, on the yield of yolk immunoglobulin were conducted to explore by a single factor experiment and orthogonal experiment. The results showed that the optimal combination was 2×10^8 cfu/mL antigen were injected into chicken chest muscle with IFA adjuvants on 3, 5weeks. Under these conditions, the yield of yolk immunoglobulin was 5.532 g. In addition, immune time had the largest impact on the yield of yolk immunoglobulin followed by antigen dosage, immunite position and adjuvants.

Key words: yolk immunoglobulin; *Escherichia coli*; preparation

免疫卵黄抗体球蛋白简称 IgY（yolk immunoglobulin），又称鸡卵黄抗体，是禽类卵黄中存在的唯一一种免疫球蛋白[1]。禽类在外界特异性抗原刺激下，诱发一系列免疫应答，激发 B 淋巴细胞分化成能分泌特异性抗体的浆细胞，浆细胞则产生大量特异性抗体（主要是 IgY、IgA 和 IgM）进入血液中。产蛋过程中，血液中的 lgY 由卵巢 lgY 受体的介导逐步进入到卵巢滤泡和输卵管中，经卵黄膜转移至卵黄并在卵黄中蓄积[2]。

免疫 1 只鸡，特异性 IgY 免疫鸡蛋的产期可长达 9~28 周，卵黄中 IgY 的含量高达 10~20 g/L，每只母鸡一年可以获得 30 g 以上的均一性 IgY，远远超过一只兔血清制备的抗体量。同时，母鸡易于饲养、费用低，免疫简单、产量大、收集方便、纯化简单、抗体活性高，而且 IgY 抗体具有对哺乳类动物的补体成分无固定作用，不与 Fc 受体结合，也不与血清成份发生反应等不同于哺乳类动物 IgG 的特殊生物学特性，而备受重视[3]。目前有大量添加 IgY 的产品如发酵酸奶、功能性食品、卫生消毒产品及化妆品等上市销售[4]。

收稿日期：2012-08-02

作者简介：黄秀锦（1967-），女，硕士，副教授，主要从事应用化学研究

本研究以猪源致病性大肠杆菌为抗原，免疫蛋鸡获取富含 IgY 的免疫鸡蛋，探讨了抗原剂量、免疫部位、佐剂种类和免疫间隔等因素对 IgY 含量的影响，并通过正交实验对免疫条件进行了优化，旨在获得最佳免疫条件，为大量制备抗大肠杆菌免疫卵黄抗体奠定技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

产蛋海兰褐蛋鸡：淮安顺丰养鸡场，25 周龄，体重 1300±100 g；猪源致病性大肠杆菌菌株：江苏食品职业技术学院微生物实验室。

10#白油：上海化学试剂总厂；鸡标准 IgY、弗氏佐剂（CFA）、弗氏不完全佐剂（IFA）、羊抗鸡 HRP-IgG：Sigma 公司；考马斯亮蓝 G-250：Promega；Na_2HPO_4、NaH_2PO_4、NaCl、乙醇、冰醋酸、PEG6000：分析纯。

TU-1900 紫外可见分光光度计，北京普析；DX-II 恒温磁力搅拌器，常州诺基；SPH-211F 恒温振荡器，上海世平；PHS-3C 酸度计，上海雷磁；HH-601 恒温水浴锅，上海新嘉；JA1003A 电子精密天平，上海伦捷；SCR20BC 高速冷冻离心机，Sigma。

1.2 实验方法

1.2.1 抗原制备

将猪源致病性大肠杆菌接种于酪蛋白平板培养基，37 ℃培养 24 h 后，用无菌 0.12 mol/L 磷酸缓冲液（PBS，pH 为 7.2，含 0.04 mol/L NaCL）洗下菌落，放入无菌的三角瓶内，在混合菌液中加入 0.5%甲醛，37 ℃灭活 18 h 备用[5]。

1.2.2 蛋鸡饲养管理

海兰褐 90 只，随机分成 16 组，每组 5 只，单笼、三层阶梯式饲养，日粮按照 NRC 蛋鸡高峰日粮标准配制[6]，自由采食，自由饮水，室内温度 24±2 ℃，相对湿度 70±10%，光照时间 12~16 h，光照强度 16 Lux。

1.2.3 IgY 的分离

参考王丽英等人[7]的方法分离制备 IgY，具体操作如下：鸡蛋洗净，0.5%新洁尔灭浸泡 20 min 后自然晾干，去除蛋清获取蛋黄，挑破卵黄膜，收集蛋黄液于量筒中测定体积，吸取 5 mL 蛋黄用 9 倍体积 PBS 进行稀释，搅拌均匀，0.1 mol/L HCl 调 pH 至 5.2，4 ℃静置 12 h，离心（10000 r/min，4 ℃）30 min 得水溶性组分（WSF），再加入 10% PEG 6000，搅拌 30 min 后离心，收集沉淀，透析后冻干得 IgY 粗品，准确称量其质量。

1.2.4 IgY 总量的测定

1.2.4.1 鸡标准 IgY 标准曲线的绘制

取比色管 6 支，分别加入 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 浓度为 100 μg/mL 的鸡标准 IgY 溶液，加水定容至 1 mL，再分别加入 1.0 g/L 考马斯亮蓝 G-250 染色液，摇匀，静置 5 min，595 nm 下测吸光度。以鸡标准 IgY 溶液质量浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线[8,9]。

1.2.4.2 IgY 质量浓度的测定

准确称取 0.05 g IgY 粗品，加水定容至 100 mL，再逐级稀释至合适倍数（将待测样品的蛋白质浓度大致控制在标准曲线范围内），按 1.2.4.1 方法取 1 mL 在 595 nm 下测定吸光度，根据标准曲线计算该蛋黄中 IgY 质量浓度。

1.2.4.3 免疫鸡蛋中 IgY 总量的测定

首免一周后，每周二、周四收集鸡蛋，连续 12 周（共 24 枚鸡蛋/只），每次收集后立即按照 2.3 测定蛋黄体积，按 1.2.4.2 测定该稀释液中 IgY 质量浓度。13 周后根据下式计算 24 枚鸡蛋中 IgY 总量。

$$Y=\sum_{i=1}^{n=24}\left(\frac{c\times 100\times n\times m\times v}{0.05\times 5\times 10^{6}}\right)$$

式中：*Y*-24 枚免疫鸡蛋中 IgY 总量（g）；100~0.05 g 粗品溶解液体积（mL）；*c*-粗品稀释液液中 IgY 质量浓度（μg/mL）；*n*-粗品稀释倍数；*m*-粗品总质量（g）；*v*-每一枚蛋黄的体积（mL）；0.05-IgY 质量浓度测定时取样量（g）；5-分离时蛋黄取样体积（mL）。

1.2.5 免疫工艺的确定

1.2.5.1 抗原剂量对 IgY 含量的影响

用 PBS 溶液调节 1.2.1 抗原菌液至细菌数为 2×10^{10}、2×10^{9}、2×10^{8}、2×10^{7}、2×10^{6} cfu/mL，与弗氏佐剂 1:1 磁力搅拌混合制备抗原乳状液，于母鸡翅下肌肉各注射不同浓度的抗原乳状液 1.0 mL 进行首免，2、3 周后相同剂量进行强化免疫。首免 1 周后，收集鸡蛋，根据 1.2.5 进行 IgY 总量测定。以 IgY 总量为评价指标考察抗原剂量对 IgY 总量的影响。

1.2.5.2 佐剂种类对 IgY 含量的影响

用 PBS 溶液调节 1.2.1 抗原菌液至细菌数为 2×10^{8} cfu/mL，与佐剂 1:1 磁力搅拌混合制备抗原乳状液，于母鸡翅下肌肉各注射抗原乳状液 1.0 mL 进行首免，2、3 周后相同剂量进行强化免疫。首免 1 周后，收集鸡蛋，根据 1.2.5 进行 IgY 总量测定。佐剂设计方案为：弗氏佐剂（CFA）、弗氏不完全佐剂（IFA）、白油佐剂（WOA）、弗氏佐剂（CFA）与弗氏不完全佐剂（IFA）1:1 混合液、弗氏佐剂（CFA）与白油佐剂（WOA）1:1 混合液。以 IgY 总量为评价指标考察佐剂种类对 IgY 总量的影响。

1.2.5.3 免疫部位对 IgY 含量的影响

用 PBS 溶液调节 1.2.1 抗原菌液至细菌数为 2×10^{8} cfu/mL，与 CFA+IFA 混合液 1:1 磁力搅拌混合制备抗原乳状液，于母鸡翅下、大腿、胸部肌肉各 1 mL，翅下和大腿各注射抗原乳状液 0.5 mL 进行首免，2、3 周后相同剂量进行强化免疫。在首免 1 周后，收集鸡蛋，根据 1.2.5 进行 IgY 总量测定。以 IgY 总量为评价指标考察免疫部位对 IgY 总量的影响。

1.2.5.4 强化免疫间隔方案对 IgY 含量的影响

用 PBS 溶液调节 1.2.1 抗原菌液至细菌数为 2×10^{8} cfu/mL，与 CFA+IFA 混合液 1:1 磁力搅拌混合制备抗原乳状液，于母鸡翅下肌肉各注射抗原乳状液 1.0 mL 进行首免，首免 1 周后收集鸡蛋，根据 1.2.5 进行 IgY 总量测定。强化免疫间隔方案分别为 A：2、3 周后相同剂量进行强化免疫；B：3、5 周后相同剂量进行强化免疫；C：4、8 周后相同剂量进行强化免疫。以 IgY 总量为评价指标考察强化免疫间隔方案对 IgY 总量的影响。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

以吸光度值为纵坐标，鸡标准 IgY 标准溶液质量

浓度为横坐标，595 nm 下吸光度为纵坐标绘制标准曲线，结果见图 1。

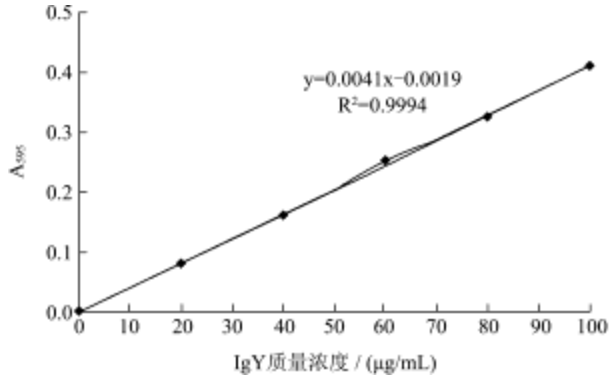


图 1 鸡标准 IgY 标准曲线

Fig.1 Standard curve of yolk immunoglobulin

由图 1 可知，在 0~100 μg/mL 范围内，鸡标准 IgY 标准曲线线性回归方程为 y=0.0041x-0.0019，相关系数 R^2=0.9994，结果符合朗伯比尔定律，表明线性良好，可用于 IgY 粗品中 IgY 质量浓度的测定。

2.2 免疫条件的确定

2.2.1 抗原剂量对 IgY 总量的影响

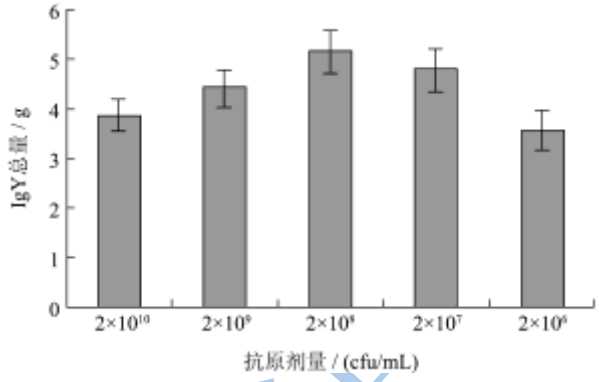


图 2 抗原剂量对 IgY 总量的影响

Fig.2 Effect of antigen dosage on the yield of yolk immunoglobulin

由图 2 可知，随着抗原剂量的增大，不同抗原剂量下收集的 24 枚鸡蛋中 IgY 总量先增加后降低。当免疫剂量为 2×10^8 时，IgY 总量达到最大值 5.15±0.41g（n=5），当剂量为 2×10^6 时，IgY 降为最小值(3.55±0.39) g。这可能是因为高剂量的抗原能较快的激活 T 细胞和 B 细胞，促使致敏阶段时间降低，效应阶段延长，免疫鸡蛋中 IgY 总量增加[2]。但过高浓度可能破坏细胞组织，促使 IgY 总量降低。因此抗原剂量为 2×10^8 左右较好。

2.2.2 佐剂种类对 IgY 含量的影响

佐剂是动物免疫工作中的重要组成部分，是一种非特异性免疫增强剂，可增强机体的免疫应答能力或改变免疫应答类型。但佐剂也会引起被免疫动物产生一些局部或全身副反应。因此选择合适的佐剂，对于提高疫苗免疫效果和减少不良反应有重要的意义[10]。

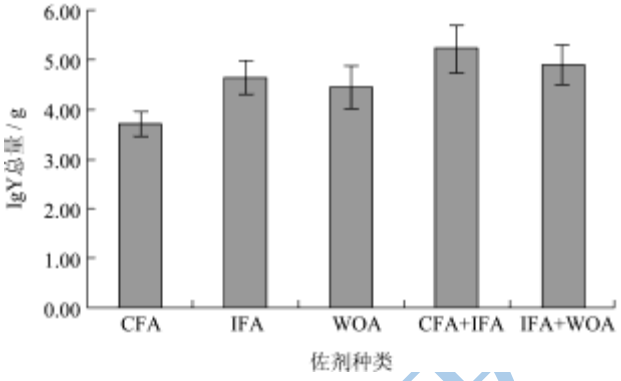


图 3 佐剂种类对 IgY 含量的影响

Fig.3 Effect of adjuvants on the yield of yolk immunoglobulin

由图 3 可知，五种佐剂对 IgY 总量的影响各不相同，CFA 与 IFA 以 1:1 比例混合使用获得的 IgY 总量最大（12 周 24 枚鸡蛋中 IgY 总量达到 5.21±0.48 g，n=5），IFA 与 WOA 以 1:1 比例混合效果次之，单独使用 CFA 产生的 IgY 最小（3.71±0.23 g）。

佐剂为油乳佐剂，能将抗原包被在油相中的微结构中，使之形成贮存库而缓慢释放，刺激机体免疫细胞持续性产生抗体，促使使动物获得较高的抗体水平[11]。5 种佐剂导致 IgY 总量不同的原因可能就是由于猪源致病性大肠杆菌与各种佐剂的包合效果不同产生的。同时各种佐剂均为油包水乳浊液，在动物体内扩散吸收效果不同，也可能导致 IgY 总量的不同。由结果还知 IFA 优于 CFA，这可能是因为 IFA 含有卡介苗，能引起巨噬细胞和致敏淋巴细胞迅速被激活，执行免疫功能，引起特异性教强免疫反应[12]。

2.2.3 免疫部位对 IgY 含量的影响

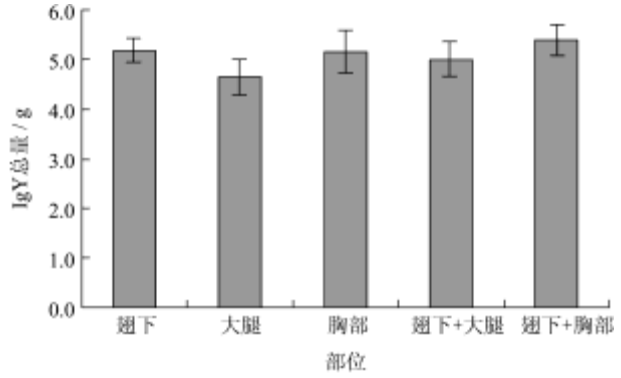


图 4 免疫部位对 IgY 含量的影响

Fig.4 Effect of immunite position on the yield of yolk immunoglobulin

由图 4 可知，不同免疫部位对 IgY 含量有较大影响，其中翅下与胸部肌肉注射各 0.5 mL 产生的 IgY 最多（12 周 24 枚鸡蛋中 IgY 总量达到 5.40±0.32 g，n=5），翅下和胸部肌肉注射相差不大，分别为 5.18±0.24 g 和 5.16±0.45 g，胸部肌肉注射效果最差，IgY 总量仅为

4.64±0.35 g。

2.2.4 强化免疫间隔方案对 IgY 含量的影响

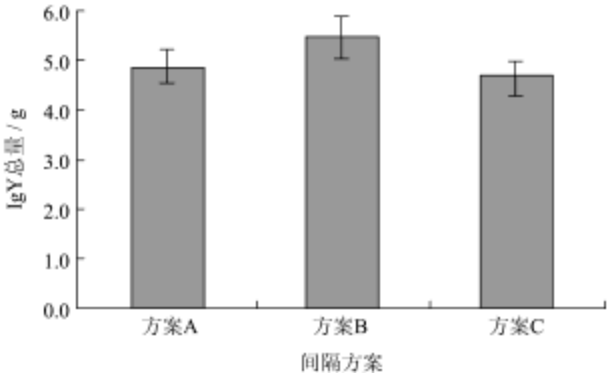


图 5 强化免疫间隔方案对 IgY 含量的影响

Fig.5 Effect of immune time on the yield of yolk immunoglobulin

由图 5 可知，三种强化免疫间隔方案对 IgY 含量影响较大，方案 B 获得的 IgY 总量最大（12 周 24 枚鸡蛋中 IgY 总量达到 5.47±0.41 g，n=5），即 3、5 周后进行强化免疫获取的 IgY 总量最大；方案 A 次之，IgY 总量为 4.87±0.34 g，方案 C 最小，IgY 总量为 4.63±0.37 g。由结果可知，方案 A 远远大于方案 B 和 C。

机体的免疫系统在外来抗原的刺激下发生免疫应答可分为 3 个阶段：即致敏阶段、反应阶段和效应阶段。致敏阶段和反应阶段是机体对抗原的识别和处理阶段[13]，产生的抗体水平不高，多为 IgM，IgY 很少，即使短时间内注射大量免疫抗原也不能产生较多的 IgY；同时，间隔较短的注射抗原，会使得抗原在动物体内的释放时间缩短，因此方案 A 获取的 IgY 含量较低。间隔时间较长的情况下，会使得 IgY 产生时间大大拉长，在方案 C 中我们仅仅收集了 12 周的鸡蛋，这仅为强化免疫后的第 4 周，IgY 仍在大量产生中，而结果却未将 12 周后产生的 IgY 计算在内，因此含量很低。

2.2.5 最佳免疫条件的确定

表 1 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels in orthogonal array design

水平	因素			
	A [抗原剂量 (cfu/mL)]	B (佐剂种类)	C (免疫部位)	D (免疫间隔方案)
1	2×10^9	CFA	翅下	间隔 A
2	2×10^8	IFA	胸部	间隔 B
3	2×10^7	CFA+IFA	翅下+胸部	间隔 C

在单因素试验的基础上，为了获得最佳免疫条件，利用正交试验法，以抗原剂量、佐剂种类、免疫部位和免疫间隔为因素，进行 $L_9(4^3)$正交试验。因素水平见表 1。采用 Excel 2007 对正交实验结果进行极差分析，结果见表 2。

表 2 正交实验结果

Table 2 Orthogonal test results

实验号	A	B	C	D	IgY 总量/g
1	1	1	1	1	4.268
2	1	2	2	2	5.425
3	1	3	3	3	3.609
4	2	1	2	3	5.085
5	2	2	3	1	5.130
6	2	3	1	2	5.493
7	3	1	3	2	5.289
8	3	2	1	3	4.676
9	3	3	2	1	5.375
K_1	13.302	14.642	14.437	14.773	
K_2	15.708	15.232	15.885	16.208	T＝44.35
K_3	15.340	14.478	14.029	13.370	
K_1	4.434	4.881	4.812	4.924	
K_2	5.236	5.077	5.295	5.403	
K_3	5.113	4.826	4.676	4.457	$\overline{X}$ ＝4.93
极差 R_X	0.802	0.251	0.619	0.946	
优水平	A_2	B_2	C_2	D_2	

极差（R_X）的大小反映了相应因素作用的大小，极差大的因素的不同水平对指标所造成的影响也较大。由表 2 可知，R_D（0.946）＞R_A（0.802）＞R_C（0.619）＞R_B（0.251），四因素对结果的影响次序为：D＞A＞C＞B，即免疫间隔方案对 IgY 总量的影响最大，抗原剂量次之，佐剂种类对 IgY 总量的影响最小。

从优化条件产生结果分析，若在同一因素下，K_i 越大，说明在 i 水平下的相对指标越好[14]。由表 2 中各水平对应的 K 值可以看出，在四因素下的 K_2 均在各自因素条件下最大，因此确定本实验的最佳组合 $A_2B_2C_2D_2$，即最佳免疫条件为：抗原剂量 2×10^8 cfu/mL、IFA 佐剂、胸部肌肉注射免疫、强化免疫间隔方案为 3、5 周。

表 3 一次方差分析表

Table 3 The first analysis of variance of orthogonal test

方差来源	偏差平方和	自由度	均方差	Sig.
A	1.120	2	0.560	-
B	0.105	2	0.052	-
C	0.635	2	0.317	-
D	1.341	2	0.671	-
误差	0.000	0	-	-

为进一步了解因素水平变化对实验结果影响的程度，利用 spss statistics 17.0 统计学软件对正交实验

结果（表 2）进行初步方差分析，结果见表 3。

从表 3 中可以看出，因素 A、B、C、D 因素 F 值没有结果，这主要是因为实验设计时没有考虑试验误差，即表中误差项自由度为 0。在正交设计中，如果没有设计重复试验，又无空白项，常取其中偏差平方和最小项作为误差估计[15]。从表 3 中可知，B 因素对整个实验结果影响最小，因而把它作为误差估计，用以检验其他因素作用的显著性。重新统计结果见表 4。

表 4 二次方差分析表

Table 4 The second analysis of variance of orthogonal test

方差来源	偏差平方和	自由度	均方差	Sig.
A	1.120	2	0.560	0.036
C	0.635	2	0.317	0.142
D	1.341	2	0.671	0.022
误差	.105	2	0.052	

从表 4 的方差分析可知：Sig_D（0.022）与 Sig_A（0.036）均小于 0.05，故 D 和 A 因素水平的变动对结果的影响是显著的；Sig_C（0.142）大于 0.05，故 C 因素对结果无显著影响，即免疫间隔方案与抗原剂量对 IgY 总量影响显著，而免疫部位和佐剂种类对结果无显著影响。

2.3 验证实验

因为 $A_2B_2C_2D_2$ 的免疫条件不在正交实验表中，所以按此条件补做 3 次验证实验，结果见表 5。

表 5 验证实验结果

Table 5 Verification test of optimal immune conditions

实验号	IgY 总量/g	平均值/g
1	5.533	
2	5.564	5.532
3	5.499	

由表 5 可知，在设定的免疫条件下，IgY 总量较高（5.532 g）且稳定，平均得率超过正交实验最大值，具有可行性和实用价值。

3 结论

以猪源致病性大肠杆菌为抗原，通过单因素实验和正交实验确定了最佳免疫条件为：抗原剂量 2×10^8 cfu/mL、佐剂为 IFA、胸部肌肉注射免疫、强化免疫间隔方案为第 3、5 周，此条件下 IgY 总量达到 5.532 g；各因素对 IgY 总量的影响依次为：免疫间隔＞抗原剂量＞免疫部位＞佐剂种类；方差分析结果表明免疫间隔方案与抗原剂量对 IgY 总量影响显著，而免疫部位和佐剂种类对结果无显著影响。

参考文献

[1] 任平国,徐启红.鸡卵黄免疫球蛋白(IgY)分离纯化的研究[J].现代食品科技,2007,23(11):24-26

[2] Rüdiger.S,张小莺,郑礼.IgY 技术及其医药应用:理论基础[J].中国药理学通报,2004,20(5):491-495

[3] Murakami N, Hayashida T, Kuroiwa T, et al. Role for central ghrelin in food intake and secretion profile of stomach ghrelin in rats [J]. Journal of Endocrinology, 2002, 174(2): 283-288

[4] 段琳,赵文锋,丁建坤,等.卵黄抗体开发现状及应用进展[J].中国生化药物杂志,2010,31(3):212-215

[5] 钟青萍,王斌,何艳萍.抗大肠杆菌 O157:H7 的卵黄特异性 IgY 的研究[J]. 现代食品科技,2008,24(3) :230-232

[6] National Research Council. Subcommittee on poultry nutrition. nutrient requirements of poultry [M]. Washington: The National Academies Press, 1994

[7] 孟凡军,田笑,丁杰,等.抗沙门氏菌 IgY 抗体的制备及其基本特性分析[J].中国热带医学,2009,9(6):1014-1016

[8] 蔡丽芬.生物化学实验指导[M].武汉:湖北科学技术出版社,2006

[9] 吕瑶.抗 HBsAg 鸡卵黄抗体的制备及 HBsAg 夹心 ELISA 检测方法的初步建立[D].成都:四川农业大学,2010

[10] 穆杨,周丽梅,侯宏虎,等.三种佐剂对鸡体液免疫影响的比较[J].动物医学进展,2007,28(10):37-39

[11] 赵萍,储岳峰,高鹏程,等.免疫佐剂的研究现状及发展动态[J].中国兽禽种业,2008,(13):66-68

[12] 蔡联燊,荣俊.2 种佐剂在传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗中的应用比较[J].长江大学学报(自然科学版),2011,8(3):236-238

[13] 朱迅.免疫学新进展[M].北京:人民卫生出版社,2002

[14] 胡志洁.SPSS 11.5 软件在正交试验设计中的应用[J].医学信息,2007,20(5):737-740

[15] 张春华,严云良.医药数理统计[M].北京:科学出版社,2001