

抗大肠杆菌 O157:H7 的卵黄特异性 IgY 的研究

钟青萍¹, 王斌², 何艳萍³

(1. 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642)(2. 广州市华南农大生物药品有限公司, 广东 广州 510642)(3. 广东燕塘乳业有限公司, 广东 广州 510507)

摘要: 以大肠杆菌 O157:H7 为抗原免疫产蛋母鸡, 从鸡卵黄中提取免疫球蛋白, 建立抗大肠杆菌 O157:H7 的特异性 IgY 的效价检测方法, 并研究母鸡的免疫应答性, 以及抗体的提取方法和体外抑菌效果。研究结果表明, 初次免疫后第 6 d, 在卵黄中可以检测到抗大肠杆菌 O157:H7 IgY, 效价为 1:7200; 经加强免疫后效价迅速上升, 至第 44 d 达到最高效价 1:230400; 免疫后 360 d, 效价仍维持在 1:7200。用水稀释法、硫酸铵分级盐析和 Sephadex G-25 凝胶过滤以提取 IgY, 提纯后 IgY 的效价是之前的 4 倍。SDS-PAGE 鉴定抗体的纯度, 电泳图谱中出现抗体的轻链和重链两条带。体外抑菌实验表明, IgY 能抑制大肠杆菌 O157:H7 的生长。

关键词: IgY; 大肠杆菌 O157:H7; 抗体效价; 抑菌作用

中图分类号: R392; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)03-0230-03

Studies on Yolk IgY Against *Escherichia coli* O157:H7

ZHONG Qing-ping¹, WANG Bin², HE Yan-ping³

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

(2. Guangzhou South China Biological Medicine Co. Ltd, Guangzhou 510642, China)

(3. Guangdong Yantang Dairy Co. Ltd, Guangzhou 510507, China)

Abstract: In this study, the specific IgY was isolated from the yolk of eggs laid by immunized hens with *Escherichia coli* O157:H7. The methods for the titer detection and isolation of the specific IgY were developed and the inhibitory effects of IgY on the bacteria *in vitro* were also studied. The results showed that the highest titer of IgY against *Escherichia coli* O157:H7 was of 1:230400 after 44 days, and still of 1:7200 after 360 days. The titer of the IgY, purified by water dilution, ammonium sulfate precipitation, and gel filtration, was 4 times higher than that of the unpurified. Two major bands were observed in the SDS-PAGE electrophorogram, which represented the heavy and the light chains. The results also demonstrated that the specific IgY could inhibit the growth of *Escherichia coli* O157:H7.

Key words: IgY; *Escherichia coli* O157:H7; antibody titer; bacteria inhibition

O157:H7 是出血性大肠杆菌 (EHEC) 中一种与人出血性结肠炎有关的主要血清型, 自 1982 年在美国首次报道了由 O157:H7 大肠杆菌引起的出血性结肠炎的暴发以来, EHEC 的感染已经成为世界性问题, 特别是 1996 年日本发生 EHEC 的大规模暴发后, 引起了我国的高度关注。EHEC 为人畜共患病病原, 人的感染方式主要为食源性的^[1]。

大肠杆菌 O157:H7 可感染任何年龄组, 但儿童和老年人比较容易感染。感染后可发生严重的溶血性尿毒症 (HUS)、血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)。可出现窦性心动过缓、惊厥等^[2]。近年来大量文献报道, 抗生素耐药现象越来越严重, 经常导致治疗肠道致病菌感染的失败, 所以采用被动免疫保护为预防肠道致

病菌感染提供了新的思路。由于鸡卵黄免疫球蛋白 (IgY) 在生产上具有哺乳动物 IgG 不可比拟的优势^[3-4], 因此制备抗大肠杆菌 O157:H7 等肠道致病菌的特异性 IgY, 可以作为一种尝试, 既可用于研制免疫检测的试剂盒, 以快速检测食品中的病原菌, 也可作为食品添加剂开发具有特定功能的食品, 以增强机体抵御肠道疾病的能力。本研究获得了高效价的抗大肠杆菌 O157:H7 的特异性 IgY, 使母鸡的免疫应答时间维持了一年以上; 并对 IgY 进行分离纯化, 考察其对大肠杆菌 O157:H7 的抑菌作用, 为其进一步的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试验母鸡: 产蛋率高的莱亨母鸡。

1.1.2 主要试剂

收稿日期: 2007-11-23

作者简介: 钟青萍 (1967-), 女, 副教授, 博士, 主要研究方向为食品微生物、食品生物技术

辣根过氧化物酶标兔抗鸡 IgY: Sigma; 邻苯二胺: Amresco 分装; SDS-PAGE 低分子量标准蛋白: 上海生物化学研究所; Sephadex G-25: Phamacia。

1.1.3 主要耗材

12 孔聚苯乙烯高结合力酶标条: 广州洁特生物制品有限公司。

1.1.4 主要仪器

16R 型台式高速冷冻离心机: 德国 Hettich Universal 公司; 6K15 型 LABCONCO 级联冷冻干燥系统; 德国 SARTORIOUS 公司; BIO-RAD 680 型酶标仪: BIO-RAD 公司; MC99-3 自动液相色谱分离层析仪: 上海青浦沪西仪器厂; VIVAFLOW200 超滤装置(截留分子量 50, 000PES): 英国 VIVASCIENCE 公司; RC10-22 离心浓缩仪: 法国 JOUAN。

1.1.5 菌种

大肠杆菌 O157:H7: 华南农业大学食品学院保藏。

1.2 抗原制备及母鸡免疫

1.2.1 抗原制备

将大肠杆菌 O157:H7 接入牛肉膏蛋白胨液体培养基中摇瓶培养后离心, 收集菌体, 用无菌生理盐水洗涤三次, 得到 10^{10} CFU/mL 菌悬液, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活。

1.2.2 母鸡免疫

初次免疫取备用菌悬液, 加入完全佐剂, 乳化, 使菌浓度为 10^9 CFU/mL, 母鸡的免疫剂量为 1 mL/只。间隔两周各追加免疫两次, 第二、三次改用不完全佐剂。同时设未免疫的对照组。

1.3 IgY 的提取

1.3.1 IgY 的粗提

采用水稀释法。用 8 倍蒸馏水稀释鸡卵黄, 调 pH 至 5.1~5.2, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置过夜, 取上清液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下以 10000 rpm 离心 30 min, 得到 IgY 水溶液, 超滤后冷冻干燥保存。

1.3.2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分级沉淀抗体

在 IgY 粗提液中加入饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液, 使 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的饱和度为 50%, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 4 h。3000 rpm 离心 15 min, 弃上清液。沉淀用少量 PBS (pH 7.4, 0.01 mol/L) 溶液溶解。然后分别用饱和度为 33% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液继续沉淀抗体, 最后的沉淀用少量 PBS (pH 7.4, 0.01 mol/L) 溶液收集, 并测定蛋白质含量, 计算盐析前后的蛋白质回收率。

1.3.3 凝胶层析脱盐

采用 Sephadex G-25, 洗脱液为 PBS 溶液 (pH 7.4, 0.01 mol/L)。收集的洗脱液用离心浓缩仪在 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下浓缩。

1.4 抗体纯度的测定

采用还原型的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 分离胶为 12%, 浓缩胶为 5%。

1.5 抗大肠杆菌 O157:H7 IgY 效价的检测

采用间接 ELISA 法, 二抗为辣根过氧化物酶标兔抗鸡 IgY, 底物为邻苯二胺。用酶标仪在 492 nm 下检测吸光值。阳性判断: (实测 OD 值-空白 OD 值)/(阴性对照 OD 值-空白 OD 值) ≥ 2.1 。阴性对照为未免疫的对照组鸡蛋。

1.6 抗体抑菌试验

取 3 支装有 8 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基的试管, 各加入 1 mL 指示菌悬液, 使细菌浓度为 10^6 CFU/mL, 向其中两支试管各加入 1 mL 不同浓度的特异性卵黄抗体, 使抗体的最终浓度分别为 1 mg/mL 和 10 mg/mL, 另一支试管作对照, 加入 1 mL 无菌的 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4)。将三支试管置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中培养, 分别在 1 h、3 h 和 5 h 各取 1 mL 培养液, 用稀释平板法计算菌落总数。每个试验均设三个重复。用 SAS 统计软件分析不同浓度的特异性抗体抑菌效果的显著性。

2 结果与分析

2.1 抗大肠杆菌 O157:H7 IgY 的产生及其效价

初次免疫后第 6 d, 在卵黄中可以检测到抗大肠杆菌 O157:H7 IgY, 效价为 1:7200。经加强免疫后效价迅速上升, 至第 44 d 达到最高效价 1:230400。第一次免疫后 90 d, 效价开始趋向稳定, 维持在 1:14400。免疫后 360 d, 效价仍维持在 1:7200 (图 1)。

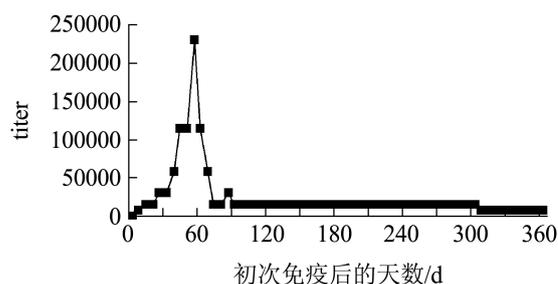


图 1 母鸡对大肠杆菌 O157:H7 抗原的免疫应答

Fig.1 Immune reaction of hens immunized with *E. coli* O157:H7

2.2 IgY 提取过程中蛋白质的回收率

测定水稀释法与超滤法联合提取的样品、盐析后的样品和层析脱盐后的样品的蛋白质含量, 分析提取过程中蛋白质的得率, 并测定其效价, 结果如下表所示。

表1 分离纯化 IgY 过程中的抗体回收情况

Table 1 Evaluation of the separation and purification methods of IgY

方法	抗体的得率/%	效价
水稀释法与超滤法联合提取	100	20000
(NH ₄) ₂ SO ₄ 分级盐析	22.78	-
层析脱盐	16.82	80000

采用水稀释法与超滤法联合提取,蛋白质的得率为100%,以饱和度50%、33%的(NH₄)₂SO₄溶液进行分级盐析沉淀卵黄上清液,在这一过程中可以去除卵黄中较多的杂蛋白,因此蛋白质的得率较低。而用凝胶过滤法脱盐,蛋白峰的一定程度的拖尾造成蛋白质得率有所下降。但经过效价测定,盐析脱盐后的样品的效价是盐析前的4倍。

2.3 纯化后卵黄抗体的纯度鉴定

把盐析脱盐后的抗体溶液稀释至0.8 mg/mL,上样进行还原型 SDS-PAGE 检测,电泳图谱上,抗大肠杆菌 O157:H7 IgY 样品分为重链和轻链两条带,分子量约为 66 KD 和 28 KD,由此可知水稀释法提取 IgY,经分级盐析和层析脱盐后基本可得较纯的卵黄抗体。

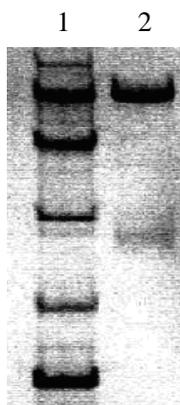


图2 IgY 的 SDS-PAGE 图谱

注: 1.低分子量标准蛋白; 2.抗大肠杆菌 O157:H7

Fig.2 SDS-PAGE chart of IgY

Note: 1: Marker 2: IgY against E. coli O157:H7

2.4 抗体抑菌试验

在三支试管内加入大肠杆菌 O157:H7 培养液,再加入不同浓度的抗体溶液,使细菌浓度为 10⁶ CFU/mL,抗体浓度分别为 0 mg/mL、1 mg/mL 和 10 mg/mL,试管置于 37 °C 恒温培养,每隔一段时间从各试管中各取样 1 mL,作系列稀释后计算菌落数目,结果如图 3 所示。由图 3 可知在大肠杆菌 O157:H7 培养液中加入特异性的 IgY 抗体能抑制大肠杆菌 O157:H7 的生长。抗体浓度不同,抑菌效果也不一样。10 mg/mL 抗体的抑菌效果要明显比 1 mg/mL 的抑菌效果好。

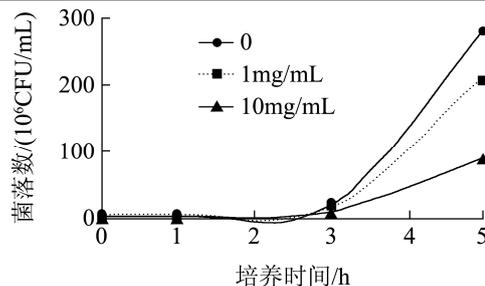


图3 不同浓度的抗大肠杆菌 O157: H7 IgY 的体外抑菌效果

Fig.3 The antimicrobial effect of different concentration of IgY

运用 SAS 数据处理系统软件分析在培养 3 h 和 5 h 时, IgY 在不同浓度下抑菌效果的显著性,结果如下表 2 所示。由表 2 可知,各实验组抗体对细菌生长的影响差别显著(p 值均小于 0.05),能有效地抑制大肠杆菌 O157:H7 的生长。

表2 不同浓度 IgY 的抑菌效果显著性分析

Table 2 Analysis of the antimicrobial effect of different concentration of IgY

抗体	T	Prob> T
1 mg/mL 抗大肠杆菌 O157: H7 IgY ^a	4.36	0.0448
10 mg/mL 抗大肠杆菌 O157: H7 IgY ^a	20.78	0.0023
1 mg/mL 抗大肠杆菌 O157: H7 IgY ^b	5.01	0.0376
10 mg/mL 抗大肠杆菌 O157: H7 IgY ^b	24.33	0.0017

注: ^a培养 3 h, ^b培养 5 h

3 结论

成功地免疫了母鸡,制备了抗大肠杆菌 O157:H7 的特异性 IgY,免疫后第 44 d 抗体达到最高效价 1:230400;免疫后 360 d,抗体效价仍维持在 1:7200。用水稀释法、硫酸铵分级盐析和 Sephadex G-25 凝胶过滤提取 IgY,提纯后 IgY 的效价大量上升。体外抑菌实验表明, IgY 能抑制大肠杆菌 O157:H7 的生长。

参考文献

[1] 冉陆. 肠出血性大肠杆菌(EHEC)流行趋势[J].中国食品卫生杂志,1999,3(21): 31-35

[2] 陈明栋.肠出血性大肠杆菌 O157:H7 的研究进展[J].上海预防医疗杂志,2000,12(5): 38-40

[3] 钟青萍,陈红兵,熊勇华,等.一种新型的食品添加剂—鸡卵黄免疫球蛋白[J].中国食品添加剂,1997,3: 50-52

[4] Alain Krief, Jean-Jacques Letesson, Denis Billen. Comparison between 'IgY technology' from chickens and 'IgG technology' from mice for production of tailor-made antibodies. Tetrahedron Letters,2002,43:1843-1846