DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.09.012

论著

文章编号:1000-5404(2002)09-1026-03

抗白色念珠菌鸡卵黄抗体(IgY)的研制

常 山,张雅萍,查晓霞,肖光夏 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察鸡蛋黄中抗体的产量、纯度、来源及稳定性。方法 应用白色念珠菌作为抗原免疫25周龄Leghorn鸡,通过改良水溶法(WD)提取蛋黄中抗体IgY,双紫外光测定抗体含量,SDS-PAGE电泳检测抗体纯度,Western blot免疫印迹法测定该抗体来源,ELISA检测热处理后的抗体活性。结果 抗体含量13 mg/ml蛋黄液,抗体纯度达到95%,Western blot免疫印迹证明该抗体与鸡血清中的IgG具有相同的分子量和抗原性。ELISA检测热处理后的抗体活性,其具有良好的热稳定性。结论 鸡蛋黄内含有丰富的抗体,通过WD水溶提取法可得到高产量,高纯度的特异性抗体IgY,证明其来源于鸡血清中的IgG,对热具有高度稳定性。

关键词:鸡卵黄抗体;IgY;白色念珠菌
中图法分类号:R379.4;R392.11 文献标识码:A

Preparation of chicken egg yolk antibody (IgY) against Candida albicans

CHANG Shan, ZHANG Ya-ping, ZHA Xiao-xia, XIAO Guang-xia (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the yield, purity and stability of IgY from chicken eggs yolk. Methods Laying hens (White Leghorn), 25 weeks old, were immunized with Candida albicans. IgY was purified with the modified simple water dilution method (WD) and its purity and yield were measured respectively with SDS-PAGE and ultraviolet spectrophotometry. The antigenicity of IgY was assayed with Western-blotting method and its stability to heat was measured with ELISA. Results Purity of IgY was about 95% and 13 mg IgY from per millilitre egg yolk was routinely obtained. Moreover IgY had the same molecular weight and antigenicity in comparison with IgG of chicken serum. Conclusion IgY from eggs yolk of laying hens immunized with Candida albicans is gotten successfully. The WD purification methods possess high yield and purity and have no adverse effect on the immunoactivity of IgY. The IgY is proved to be the IgG from chicken serum and has favorable stability to heat.

Key words: egg yolk antibody; IgY; Candida albicans

鸡蛋黄中含有大量来源于血清的IgG抗体(又名IgY),蛋黄中抗体浓度远高于血清,鸡对绝大多数抗原刺激1周后均能产生抗体,1只鸡可获得高特异性抗体长达28周,目前IgY抗体提取方法日益成熟,简单高效,对抗体活性影响小,因而可获得大量均一性良好的多克隆抗体。由于IgY具有高度的稳定性和生物学活性,目前许多学者将其用于口服预防和治疗轮状病毒腹泻,预防脊髓灰质炎,甲型肝炎和口腔疾病并取得满意效果。同时由于IgY的FC段与一般哺乳类抗体不同即它与哺乳类补体结合能力较低,与类风湿因子(RF)几乎不结合,因而作为检测试剂时更能避免实验干扰。本研究用白色念珠菌作为抗原,提取抗白色念珠菌IgY,发现其产量大、纯度高,并通过ELISA系统检测了其对热处理后的稳定性,为其保存和消毒奠定了基础。

基金项目:重庆市科委院士基金资助项目(980010)
作者简介:常 山(1969-),男,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事烧伤肠源性感染防治方面的研究,现在解放军47医院外二科工作。电话:(028)3016822
收稿日期:2001-02-25;修回日期:2001-06-08

1 材料和方法

1.1 动物

购于第三军医大学实验动物中心25周龄Leghorn鸡,常规饲养。

1.2 抗原

白色念珠菌CMCC44104,本所保存菌种,经沙氏培养平板传代3次,收集白色念珠菌,用生理盐水反复洗涤3次离心收集,将白色念珠菌置于0.4%福尔马林液中,于37 ℃24 h灭活。用0.01 mol/L PBS缓冲液洗涤3次,并将念珠菌调成2×10^9/ml备用。取等量的菌液和不全福氏佐剂混合(不全福氏佐剂 羊毛脂比液状石蜡7∶3)每毫升混合液加入卡介苗2.5 mg,充分乳化作为免疫抗原备用。

1.3 免疫

2只25周龄Leghorn鸡,每只每次注射1 ml免疫原,同时注射4个部位:双翅膀皮下注射,左右背部皮下注射。首次免疫后2周加强免疫1次,以后每月用不全福氏佐剂免疫,共计免疫4次。观察免疫部位未发现溃烂。

首次免疫后10 d收集鸡蛋,将鸡蛋置于4 ℃保存备用。

1.4 卵黄抗体IgY的分离和纯化

IgY的分离和纯化采用简单高效的水溶法(WD),具体步骤如下:①分离提取蛋黄液。②将蛋黄液用9倍体积蒸馏水稀释并调节pH值为5.1,4 ℃放置6 h。③离心留上清得WSF(Water

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

solve Fract)。④加入 18%硫酸钠离心留沉淀并溶于一定体积的 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 中。⑤加入 14%硫酸钠离心留沉淀并溶于一定体积的 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 中。⑥过滤灭菌。

1.5　IgY 对白色念珠菌的酶联染色反应

①白色念珠菌 CMCC44104 进行涂片并热固定。②将提取的 IgY 稀释为原蛋黄体积的 100 倍, 滴加于玻片上 37 ℃作用 30 min 后充分洗涤。③滴加二抗(HRP 酶标兔抗鸡 IgG, 为加拿大 British Columbia 大学 Nakai 教授惠赠 Sigma 产品, 产品号: A9046, 稀释浓度为 1∶1 000)。④滴加 DAB(博士德公司, 产品号: ED1022)显色液并显微镜观察。

同时用绿脓杆菌, 葡萄球菌作为处理对照, 并用未免疫鸡的 IgY 作为阴性对照。

1.6　蛋白含量, SDS-PAGE 电泳, Western blot 免疫印迹

采用 260 nm 和 280 nm 双波长测定提取物中蛋白含量。采用常规 SDS-PAGE 法电泳检测提取物中 IgY 的纯度和分子量, 分离胶浓度为 7%。并设鸡血清为对照。并行 Western blot 免疫印迹, 二抗为 HRP 酶标兔抗鸡 IgG, 稀释比为: 1∶10 000。

1.7　ELISA 观测 IgY 的热稳定性

将提取 IgY 稀释为原蛋黄体积并分别置于 25、37、50、64、70、75、80 ℃作用 15 min 后稀释 5 000 倍进行 ELISA 检测。步骤: ①将白念菌用 10% 甲醛缓冲液固定过夜后用 pH 8.5 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液稀释为 3×10^8 cfu/ml ②包被 96 孔酶联板 4 ℃72 h ③依次加入不同温度作用后的 IgY 稀释液(每组 4 孔); 兔抗鸡 IgG 二抗浓度(1∶10 000); 邻苯二胺底物显色 30 min 后一滴 2 mol/L 硫酸终止反应 ④492 nm 比色 ⑤洗涤液为 0.05% Tween-20 pH 7.4, 0.01 mol/L PBS ⑥阳性对照为未处理 IgY 稀释液, 阴性对照一抗为未免疫鸡蛋黄提取物。

2　结果

2.1　IgY 酶联染色

抗白色念珠菌 IgY 对该菌染色阳性见图 1, 而对绿脓杆菌, 葡萄球菌染色阴性, 未免疫鸡的蛋黄 IgY 对白念菌染色阴性。

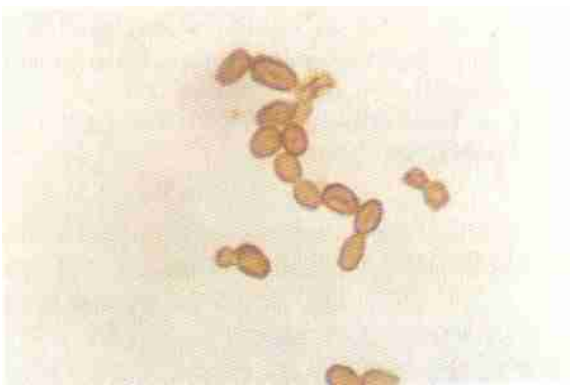


图 1　白色念珠菌的酶标染色, 并可见菌体出芽

Fig 1　Obtained IgY positively against Candida albican

2.2　蛋白含量, IgY 纯度与分子量及 IgY 的抗原性

通过双波长测定出提取物中蛋白含量平均为 13.7 mg/ml 蛋黄液。

SDS-PAGE 电泳显示蛋黄液提取物基本呈现为一条蛋白带, 见图 2。通过凝胶扫描显示其纯度高达 95%, 而鸡血清中该带纯度不足 50%且含有较多低分子量和高分子量带, 见图 3。

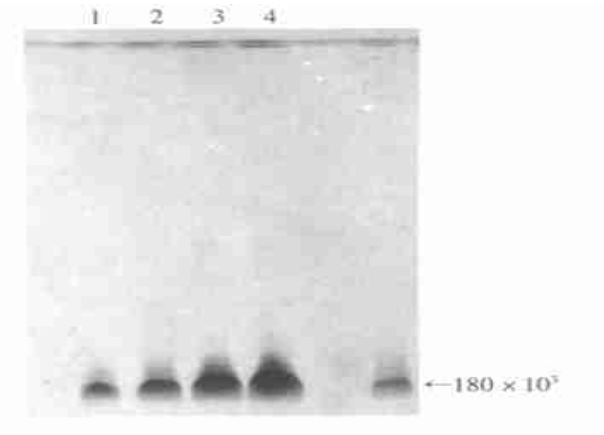
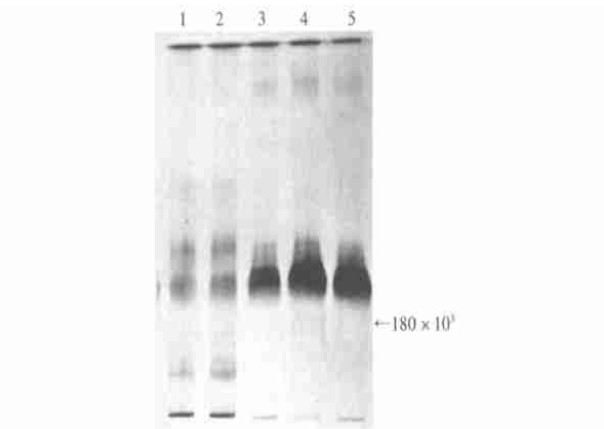


图 2　IgY 抗体的 SDS-PAGE 电泳, 从 1~4 的加样量逐渐增加

Fig 2　SDS-PAGE electrophoresis of IgY with increasing samples from lane 1 to lane 4



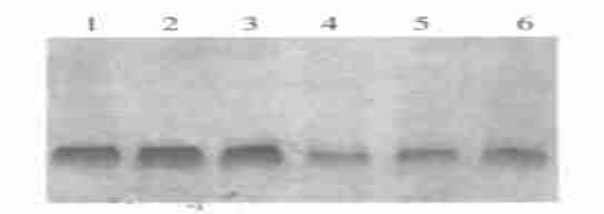
1—2: IgG from chicken serum; 3: extracted IgY; 4: Purified IgY

图 3　IgY 抗体的 SDS-DAGE 电泳

Fig 3　SDS-PAGE electrophoresis of IgY

每毫升蛋黄液中含有 IgY 高达 13 毫克, 每个鸡蛋含有约 10 ml 蛋黄液, 按每只鸡每天产 1 个蛋, 一只鸡持续加强免疫后可保持高滴度抗体长达 28 周, 可以看出 IgY 抗体的来源是十分丰富的。

免疫印迹试验显示, 蛋黄提取物和鸡血清二者均在高分子量附近出现单一的特异性酶染条带, 表明蛋黄提取物和鸡血清中目的条带均为鸡 IgG 分子, 具有相同的抗原性, 证明蛋黄中的 IgY 为鸡血清中 IgG 转移而来且其分子量与 IgY 相同为, 已知鸡血清 IgG 分子量为 180×10^3, 见图 4。



1~3: Purified IgY; 4~6: IgG from chicken serum

图 4　IgY 抗体免疫印迹

Fig 4　Western blot of IgY

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.3 IgY 的热稳定性

以温度为横轴以 ELISA 吸光值为纵轴，各温度处理后的吸光值形成一曲线，见图 5。从曲线中可以看出在体温 37 ℃情况下 IgY 活性下降甚微。在 64 ℃作用 15 min 之前 IgY 的活性下降在 30% 多，50 ℃～64 ℃为一相对稳定的平台期，而在 70 ℃作用 15 min 后 IgY 的活性迅速下降。

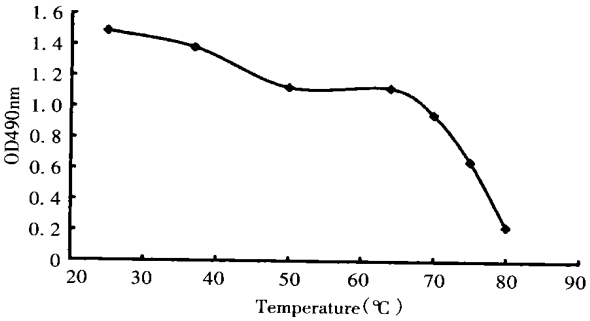


图 5 蛋黄 IgY 抗体活性与温度之间的关系

Fig 5 Relationship of the antigenicity of IgY with temperature

3 讨论

目前 IgY 已经引起广大研究人员的兴趣，它主要有三个特性：①产量大提取可行；②具有高度的稳定性和生物效应；③作为诊断试剂干扰小。

本研究采用改良的 WD 法提取 IgY 得到的产量高达 13.7 mg/ml 蛋黄液，来源十分丰富；纯度高达 95%；经免疫印迹证实 IgY 为来源于鸡血清中的 IgG。以往提取方法较多，但程序复杂，产量和纯度均不很高，加拿大 British Columbia 大学 Nakai 将其提出的水溶(WD)法进一步改良，使得产量和纯度明显提高，且方法简便可工业化生产，较其它如 PEG、DS 等法具有明显优势。经过该法提取的 IgY 活性无明显影响，能特异结合白色念珠菌而不结合其它革兰氏阴性和阳性菌，菌体染色清晰，背景干扰小，特异性强，可进一步开发作为白色念珠菌的快速简便的诊断试剂。

既往有学者采用抗体中和滴度法检测 IgY 的稳定性，发现其具有良好的耐酸，耐热的理化性质，本研究首次采用较敏感的 ELISA 法对 IgY 的稳定性进行研究再次发现 IgY 具有高度的稳定性，在通常情况下 IgY 基本能耐受巴氏消毒(63 ℃15 min)，在温度为 37 ℃的体温状态下其活性基本无明显改变，这种稳定的理化性质对 IgY 作为诊断试剂和作为治疗药物都是十分有利和必要的。

目前已成功提取出抗小分子蛋白质、病毒、细菌的 IgY，并发现其具有高度结合抗原的能力和良好的抗病毒抗细菌的生物学效应。本研究首次提取出抗真菌的 IgY。IgY 抗体不仅安全性好，而且鸡蛋来源丰富，造价低，抗体含量高，稳定性极好，作为口服药物或食品添加剂预防和治疗病原性腹泻和肠源性感染具有广阔的前景。由于 IgY 的免疫学性质，其作为诊断试剂的价值更是受到越来越多人的重视。

参考文献：

[1] Akita E M, Nakai S. Comparision 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, 160(2): 207－214.

[2] Terzolo H R. Agglutination of hen egg-yolk immunoglobulins (IgY) against Salmonella enterica, serovar enteritidis[J]. Rev Argent Microbiol, 1998, 30(2): 84－92.

[3] Hansen P, Scoble J A. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. [J] J Immunol Methods, 1998, 215(1－2): 1－7.

[4] Hajime HATTA. Oral passive immunization effect of anti-human rotavirus IgY and its behavior against proteolytic enzymes[J]. Biosci Biotech Biochem, 1993, 57(7), 1 077－1 081.

[5] Akita E M, Nakai S. Neutralization of Enterotoxigenic Escherichia coli Heat-labile Toxin by Chicken Egg Yolk ImmunoglobulinY and Its Antigen-bind Fragments[J]. Food Agric Immunol, 1998, 10(2): 161－172.

[6] Li X. Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens[J]. Poult Sci, 1998, 77(2): 266－270.

[7] 常 山，张雅萍. 鸡卵黄免疫球蛋白抗体(IgY)研究进展[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(6): 19－22.

(编辑 汪勤俭)

(上接 1025 页)

讨论

本组病人术后低温不醒的特点：在层流手术间，中央空调降温，发生在夏季，室内温度降得过低(17 ℃～20 ℃)；胸腔手术反复大量冲洗液体，以致引起热量丢失；例 2 年龄大，病情重，手术时间长；加温处理有效，且麻醉药量小。

围手术期低温的危害：低温易引起药物代谢缓慢，苏醒延迟，呼吸抑制。低温可导致心功能恶化[1]，抑制窦房结，使心内传导减慢，心每搏输出量降低，心率减慢，血压下降，发生心律紊乱，心室纤颤，尤其对老年人死亡率明显增加。

防止术中体温降低的措施：应该重视围术期低温这一麻醉并发症[2]，术中及术后也要采取积极的保温措施如电热毯，输血(液)加温器，尤其对年老体弱及机能情况差者，应控制室内温度 22℃～24℃为宜，对长时间大创面手术病人常规鼻咽温度监测，避免大量冷液冲洗胸腔，麻醉药量应适当减少。

关键词：麻醉；苏醒延迟；低温；围术期；层流手术室

中图法分类号：R614.2^{+}5 文献标识码：B

参考文献：

[1] Lichtenstein S V, Ashe K A, Dalati H, *et al*. Warm heart surgery[J]. J Thorac Cardiovasc Surg 1991, 101(2): 269－274.

[2] Frank S M, Higgins M S, Breslow M J, *et al*. The catecholamine, cortisol and hemodynamic responses to mild perioperative hypothermin[J]. Anesthesiology, 1995, 82(1): 83－93.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net