DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.032
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

文章编号:1000-5404(2002)10-1199-03

论著

鸡抗内毒素卵黄抗体 IgY 的制备

常 山,张雅萍,赵永亮,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 研究分别应用内毒素(LPS)、类脂A(LipidA)和大肠杆菌突变株J5免疫鸡后其蛋黄中抗内毒素抗体IgY的产量、纯度、效价并筛选最佳免疫抗原。方法 分别应用内毒素(LPS)、类脂A(LipidA)和大肠杆菌J5突变株作为抗原免疫25周龄Leghorn鸡,水溶法(WD)提取蛋黄中抗体IgY,双紫外光测定抗体含量,SDS-PSGE电泳检测抗体纯度,细菌酶联染色和ELISA检测抗体特异性、效价及筛选最佳免疫抗原。结果 3种抗内毒素IgY含量和效价分别为14.4 mg/ml和1∶12 800(J5)、10.61 mg/ml和1∶12 800(LPS)、9.26 mg/ml和1∶3 200(LipidA),抗体纯度均为95%左右。结论 大肠杆菌突变株J5和内毒素(LPS)为最佳免疫抗原,免疫鸡后其蛋黄中抗内毒素抗体IgY的产量和效价最高。

关键词:鸡卵黄抗体;IgY;内毒素;脂多糖;类脂A;J5
中图法分类号:R392.11;R392.12 文献标识码:A

Preparation and screening of anti-endotoxin IgY *in vitro*

CHANG Shan, ZHANG Ya-ping, ZHAO Yong-liang, XIAO Guang-xia (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe yield, purity and titer of anti-endotoxin IgY isolated from 3 kinds of eggs yolk of hens immunized respectively with J5 mutant of *E. coli*, lipopolysaccharide (LPS) and lipid-A. Methods Laying hens (White Leghorn), 25 weeks old, were immunized respectively with J5 mutant of E. coli, lipopolysaccharide and lipid-A. Three kinds of IgY were purified respectively by using the water dilution method (WD), and their purity and yield were measured respectively with SDS-PAGE and ultraviolet spectrophotometry. The titer of IgY and specificity of IgY was assayed with ELISA and enzyme-immunochemistry respectively. Results Yield and ELISA titer of 3 kinds of IgY were 14.4 mg/ml and 1∶12 800 for J5, 10.61 mg/ml and 1∶12 800 for LPS, 9.26 mg/ml and 1∶3 200 for Lipid-A respectively. The purities of the IgY were all about 95%. Conclusion The yield and titer of anti-endotoxin IgY from eggs yolk of laying hens immunized respectively with J5 mutant of E. coli and LPS are much more higher than those from Lipid-A group. J5 mutant and LPS are two kinds of better antigen to stimulate anti-endotoxin antibody IgY.

Key words: IgY; endotoxin; J5; lipopolysaccharide; Lipid-A

免疫鸡蛋黄中含有大量来源于血清的IgG抗体(又名IgY),浓度远高于血清,维持时间长达28周。目前IgY抗体提取方法成熟,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,许多学者将其用于口服防治轮状病毒腹泻,脊髓灰质炎,甲型肝炎和其它肠道感染性疾病并取得满意效果。本研究意在制备抗内毒素IgY抗体,并筛选出抗内毒素抗体的最佳免疫抗原,为大规模制备口服抗内毒素抗体奠定基础。

1 材料和方法

1.1 免疫

培养收集大肠杆菌J5突变株,于0.4%福尔马林液中,37 ℃ 24 h灭活,用0.01 mol/L PBS缓冲液洗涤3次,并将J5菌调成2×10^9/ml备用。将内毒素(LPS, Sigma, L-4130, 来源于O111B4)和类脂A(Lipid A, Sigma, L-5399)均配成600 μg/ml备用。分别取上述3种液体和等量完全福氏佐剂混合(羊毛脂∶液体石蜡7∶3,每毫升混合液加入卡介苗2.5 mg),并充分乳化作为免疫抗原备用。25周龄Leghorn鸡,每只每次注射1 ml免疫原,分4个部位皮下注射(双翅膀皮下,左右背部皮下),每2周加强1次。首次免疫后2周收集鸡蛋于4 ℃保存备用。

1.2 IgY的分离和纯化

IgY的分离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,4 ℃放置6 h。③离心留上清得WSF(Water Solve Fract)。④分别加入18%和14%硫酸钠溶解后离心留沉淀。⑤透析过夜并过滤除菌。

1.3 蛋白含量和纯度检测

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。

1.4 抗内毒素IgY的细菌酶标染色

1.4.1 取4种细菌作酶标染色,分别为:大肠杆菌J5突变株;普通大肠杆菌E-coli(25922);临床分离的绿脓杆菌;金黄色葡萄球菌,分别涂片并热固定。

1.4.2 将提取的3种抗内毒素IgY用pH 7.4 0.01 mol/L PBS分3个浓度稀释后(1∶10; 1∶100; 1∶1 000)滴加于玻片上37 ℃作用30 min后充分洗涤。

1.4.3 滴加二抗(HRP酶标兔抗鸡IgY,加拿大British Columbia大学Nakai教授惠赠Sigma产品)。

1.4.4 滴加DAB显色液并显微镜观察,并用未免疫鸡的IgY作为阴性对照。

基金项目:中关村第三军医大学新药联合开发基金资助项目
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的防治方面的研究,现在解放军第47医院外科工作,成都 610500。电话:(028)3016822
收稿日期:2001-08-20;修回日期:2001-12-20

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

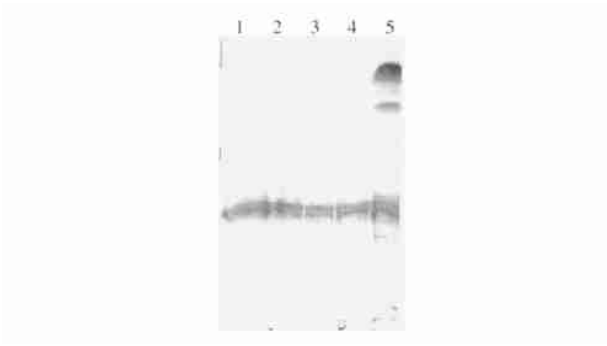
1.5 ELISA 检测 IgY 抗类脂 A 效价

分别将 3 种抗内毒素抗体 IgY 从 1∶10 倍比稀释至 1∶51 200 检测其效价。ELISA 操作步骤：① 将类脂 A（Lipid A, Sigma, L-5399）用 0.02 mol/L pH 7.4 的 PBS 包被液稀释为 4 μg/ml，包被 96 孔酶联板，4 ℃ 24 h（湿盒中）。② 依次加入 3 种 IgY 的不同稀释液（每组 4 平行孔）；HRP 酶标兔抗鸡 IgY 二抗工作液；邻苯二胺底物显色 30 min 后 1 滴 2 mol/L 硫酸终止反应。③ 于 492 nm 比色。④ 洗涤液为 0.05% Tween-20 pH 7.4 0.01 mol/L PBS。⑤ 阴性对照的一抗为未免疫鸡蛋黄提取物。

2 结果

2.1 蛋白含量和 IgY 纯度

双波长测定出 3 种抗内毒素抗体含量分别为 14.4 mg/ml（J5）；10.61 mg/ml（LPS）；9.26 mg/ml（LipidA），SDS-PAGE 电泳显示 3 种蛋黄液提取物基本呈现为一条蛋白带，见图 1，通过凝胶扫描显示其纯度均在 95% 左右，而鸡血清中该带纯度不足 50% 且含较多低分子和高分子量带。



1：Anti-J5 IgY；2：Anti-LPS IgY；3：Anti-Lipid-A IgY；4：IgY from egg yolks of non-immunized hens；5：IgY from immunized chicken serum

图 1 IgY 的 SDS-PAGE 电泳

Fig 1 SDS-PAGE electrohorogram of IgY

2.2 3 种 IgY 对细菌的酶标染色

3 种抗内毒素 IgY 及未免疫鸡 IgY 在不同稀释度下对 4 种菌的酶标染色强度，见表 1。

表 1 4 种 IgY 对 4 种细菌的酶标染色情况

Tab 1 Four kinds of bacteria staining with 4 kinds of IgY

Strains staining	Species of IgY	Dilution ratio of IgY		
		1∶10	1∶100	1∶1 000
E. coli J5 mutant	Anti-J5IgY	(+++)	(+++)	(++)
	Anti-LPS IgY	(+++)	(+++)	(++)
	Anti-LipidA IgY	(+++)	(+++)	(+)
	Non-immune IgY	(+)	(−)	(−)
E. coli（25922）	Anti-J5 IgY	(+)	(−)	(−)
	Anti-LPS IgY	(+)	(−)	(−)
	Anti-LipidA IgY	(±)	(−)	(−)
	Non-immune IgY	(+)	(−)	(−)
Bacillus pyocyaneas	Anti-J5 IgY	(±)	(−)	(−)
	Anti-LPS IgY	(±)	(−)	(−)
	Anti-LipidA IgY	(±)	(−)	(−)
	Non-immune IgY	(±)	(−)	(−)
Staplylocoaus aureaus	Anti-J5 IgY	(±)	(−)	(−)
	Anti-LPS IgY	(±)	(−)	(−)
	Anti-LipidA IgY	(±)	(−)	(−)
	Non-immune IgY	(±)	(−)	(−)

2.3 3 种 IgY 抗类脂 A 的效价

ELISA 检测出 3 种 IgY 抗类脂 A 的稀释度与吸光值关系，见图 2，横轴为稀释对数刻度，取阴性对照的 A 值 0.021 为纵轴原点，通过计算，三者效价分别为 1∶12 800（J5）；1∶12 800（LPS）和 1∶3 200（LipidA）。

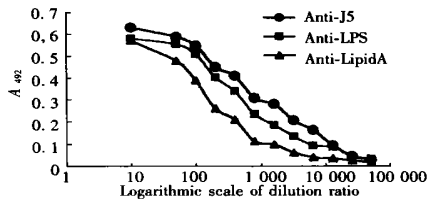


图 2 3 种抗内毒素（Lipid A）IgY 稀释度与吸光度值关系

Fig 2 Activities of 3 kinds of IgY at different dilution ratios

3 讨论

内毒素为临床常见 G^- 杆菌所释放的毒素，活性部位为类脂 A，是引发感染性休克的重要病因。防治内毒素性休克一直是国内外研究的热点。抗内毒素抗体防治内毒素性休克已经得到了肯定，但从应用大肠杆菌突变株 J5 免疫获得的抗内毒素多克隆抗血清到筛选出抗类脂 A 单抗以及国内外实验室生产的抗内毒素基因工程抗体，离临床应用均有一段距离。近年来免疫鸡卵黄抗体 IgY 因其产量大，提取简便，高度的稳定性以及良好生物活性而倍受关注，这给应用抗体防治内毒素带来新的突破点。

本研究采用 3 种免疫抗原分别免疫鸡，蛋黄中 IgY 抗体产量分别为（J5）14.4 mg/ml，（LPS）10.61 mg/ml，（LipidA）9.26 mg/ml，应用 J5 免疫得到的产量最高，3 种提取物纯度均在 95% 左右，表明采用水溶法（WD）提取能获得高产量高纯度的蛋黄 IgY 抗体。

3 种抗体在 1∶1 000 稀释度均能对大肠杆菌 J5 株染色见表 1，但 3 种抗体在 1∶100 和 1∶1 000 稀释度时对普通大肠杆菌（25922）、绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌染色均阴性（与未免疫鸡蛋黄抗体的染色情况相同），表明 3 种抗体具有很高的特异性，其主要为抗内毒素活性部位类脂 A 的抗体，因而均能结合裸露在 J5 菌表面的类脂 A，且 J5 和 LPS 免疫的 IgY 染色效价最高。普通大肠杆菌、绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌因类脂 A 未裸露于菌体表面或不含内毒素而不能结合 3 种抗内毒素抗体。同时还表明免疫鸡和未免疫鸡均存在低度的一过性普通大肠杆菌、绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌感染，因而在 1∶10 的稀释度时存在非特异性染色。

从 3 种 IgY 抗类脂 A 的 ELISA 检测图 2 可以看出 J5 和内毒素的免疫效果最好，其抗类脂 A 的效价高达 1∶12 800；而类脂 A 免疫的效果较差，效价为 1∶3 200，与细菌酶标染色结果一致。

大肠杆菌 J5 突变株由于类脂 A 裸露于菌体表面而成为主要抗原，免疫鸡后产生的抗体主要为抗类脂

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

A 抗体，不仅特异性好，且效价较高、产量最大。内毒素免疫，其活性部位类脂 A 也刺激产生了大量抗体，特异性较好，效价与产量均较高。而应用单纯类脂 A 免疫虽然抗体特异性好，但由于其本身抗原性弱，激发抗体的效价和产量均较低。本研究结果表明在大量制备抗内毒素抗体 IgY 时，应用大肠杆菌突变株 J5 和内毒素免疫效果较好，产生抗体特异性高，且以抗类脂 A 抗体为主。

本研究制备出抗内毒素 IgY 抗体并筛选出最佳免疫抗原，为大规模制备抗内毒素抗体奠定了基础。IgY 抗体不仅安全性好，而且鸡蛋来源丰富抗体含量高、稳定性极好、提取方法简便且获得的纯度高，作为口服药物或食品添加剂防治重危病人肠源性内毒素移位将具有广阔的前景。

参考文献：

[1] Sasse M, Hlinak A. Generation and characterization of avian vitelline antibodies against lipopolysaccharide and lipid A. 2. Investigations of specificity of egg yolk antibodies (IgY) against endotoxin[J]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 1998, 111(4): 127—133.

[2] Sasse M, Kruger M, Schade R, *et al*. Generation and characterization of avian vitelline antibodies against lipopolysaccharide and lipid A. 1. Induction and preparation of specific egg yolk antibodies (IgY) against endotoxins. [J]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 1998, 111(4): 121—126.

[3] 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.

[4] Terzolo H R, Sandoval V E, Caffer M I, *et al*. Agglutination of hen egg—yolk immunoglobulins (IgY) against Salmonella enterica, serovar enteritidis [J]. Rev Argent Microbiol, 1998, 30(2): 84—92.

[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, Nakano T, Sunwoo H H, *et al*. 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.

[8] 常 山，张雅萍，肖光夏. 抗白色念珠菌 IgY 的稳定性与应用研究[J]. 第三军医大学学报，2001, 23(12): 1 390—1 392.

（编辑 郭建秀）

文章编号：1000-5404(2002)10-1201-01

个案与短篇

活动平板试验对冠状动脉狭窄的预测价值

Value of treadmill exercise test in predicting coronary artery stenosis

杨 柳，迟路湘 （第三军医大学附属西南医院心内科心电图室，重庆 400038）

活动平板试验由于其安全、可信度高，近年来作为一种对冠心病患者非创伤性检查，广泛应用于临床工作[1]。本研究通过对 2000 年 7 月至 2002 年 7 月 447 例冠脉造影结果患者的活动平板试验的分析，旨在进一步探讨活动平板试验对诊断冠状动脉狭窄病变的意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料

447 例患者，男性 387 例，女性 162 例，平均年龄(56.8±2.43)岁。选择性冠状动脉造影结果证实为冠心病 279 例。冠脉造影前均行活动平板试验。

1.2 方法

冠状动脉造影采用 GE LCV-300 1250 mAX-ray 机，经股动脉 Judkin 法造影并多体位投照，以通用直径法估测右冠状动脉、左冠状动脉主干、左前降支、左回旋支及其大分支中任意一支狭窄≥50%者为阳性[2]。活动平板采用美国 GE 公司的 Marquette-Cardiosis 运动试验仪，根据患者年龄、身体状况等选择 Bruce 或修正的 Bruce 活动平板方案[3]。

2 结果

447 例冠脉造影患者中，387 例活动平板试验呈现阳性表现，60 例阴性，阳性检出率为 86.58%。279 例冠脉造影阳性患者中，活动平板试验阳性 252 例，阴性 27 例。敏感性 90.32%，特异度为 19.64%；阳性预测值为 65.12%，阴性预测值为 55.00%。

279 例冠脉造影阳性患者中 252 活动平板阳性患者的 S—T 段下移程度与出现及持续时间见表 1。

表 1 活动平板试验 S-T 段改变与冠脉造影结果

		单支病变 $n=163$	多支病变 $n=89$
运动中	S-T 段下移(mV)	0.12±0.04	0.17±0.09**
	出现时间(min)	5.69±1.81	2.73±0.76**
	运动负荷(MET)	7.57±0.93	4.48±0.32**
运动后	S-T 段下移(mV)	0.10±0.05	0.15±0.06**
	持续时间(min)	3.54±0.85	4.65±0.72**

**：$P<0.01$ 与单支病变比较

3 讨论

冠状动脉的血供有强大的代偿能力，仅在冠状动脉病变使血供下降至正常的 30%～65%时才会出现心电图改变[4]。活

（下转 1204 页）

作者简介：杨 柳(1966—)，女，重庆市人，主管技师，主要从事心电学临床方面的研究。电话：(023)65318301-73051

收稿日期：2002-03-10；修回日期：2002-07-18

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