

特异性抗肠出血性大肠杆菌 O157:H7 内毒素鸡卵黄抗体的制备

宋宏新¹, 刘晓阳¹, 程 军¹, 李书丰²

(1. 陕西科技大学生命科学与工程学院 陕西 咸阳 712081; 2. 德州职业技术学院 山东 德州 253034)

摘 要: 目的: 比较研究 LPS 和 O-SP 的免疫原性, 制备出特异性抗内毒素(LPS)鸡卵黄免疫球蛋白(egg yolk immunoglobulin, IgY), 用于对 *E. coli* O157:H7 的免疫预防及检测。方法: 分别用灭活 *E. coli* O157:H7 菌体、不同浓度内毒素(LPS)及 O- 特异性多糖链(O-SP)与不完全弗氏佐剂充分乳化后作抗原免疫临产蛋母鸡, 以水稀释法从卵黄中提取抗体, 阴离子交换色谱法实现对抗体的纯化, 间接 ELISA 及双向免疫扩散检测抗体产生效价与活性。结果与结论: 所制内毒素(LPS)和 O-SP 均有较好的免疫原性, 刺激鸡体后可产生高效价抗体, 灭活菌体、600 µg/ml LPS、1200 µg/ml LPS、2000 µg/ml LPS、O-SP 抗体产生效价最高可分别达 1: 32000、1: 28000、1: 32000、1: 12000、1: 40000。结合离子交换色谱, 用 0.185 mol/L 的离子强度可实现一步洗脱纯化抗体, 制备出高纯度、高活性、特异性强的鸡卵黄免疫球蛋白 IgY, 为大肠杆菌 O157:H7 的感染防治提供了可靠的保证, 在此实验基础之上可进一步探讨应用特异性 IgY 对大肠杆菌 O157:H7 的检测。

关键词: *E. coli* O157:H7; 防治; 内毒素; 鸡卵黄抗体; 制备

Preparation Study on Specific Egg Yolk Antibody against Endotoxin of *Escherichia coli* O157:H7

SONG Hong-xin¹, LIU Xiao-yang¹, CHENG Jun¹, LI Shu-feng²

(1. College of Life Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 712081, China;
2. Dezhou Vocational and Technical College, Dezhou 253034, China)

Abstract: Objective: To produce specific chicken egg yolk immunoglobulin against lipopolysaccharide (LPS), used for preventing and detecting *E. coli* O157:H7 in comparison with the immunity of LPS and O-specific polysaccharide (O-SP). Methods: Hens, 25-week old, were immunized with *E. coli* O157:H7, LPS, O-SP respectively after being emulsified with incomplete Freund's adjuvant. By a simple method of water dilute of protein IgY to separate the antibody from egg yolk, purified by ion-exchange chromatograph, the IgY detected by SDS-PAGE and indirect-ELISA, and its immunologic competence was determined by double immunodiffusion. Results and Conclusion: The IgY titers of *E. coli* O157:H7 are obtained with 600 µg/ml LPS, 1200 µg/ml LPS and 2000 µg/ml LPS, as O-SP respectively 1: 32000, 1: 28000, 1: 32000, 1: 12000 and 1: 40000. It is purified by ion exchanging with 0.185 mol/L THS washing. The immunity of lipopolysaccharide and O-SP is strong. The IgY anti-O-SP produced by immunizing hens shows high titer, high purification and well specificity by chicken egg yolk immunoglobulin. The results provide scientific basis for preventing and infection curing by O157:H7 and further ways exploring of detecting O157:H7 with

收稿日期: 2005-11-01

作者简介: 宋宏新(1959-), 男, 教授, 研究方向为分子生物学及食品检测。

- [9] mal tooligosyl fructofuranosides catalyzed by immobilized cyclodextrin glucosyl transferase using starch as donor[J]. Tetrahedron, 2004, 60: 529-534.
- [10] SZENTE L, SZEJTLI J. Cyclodextrins as food ingredients[J]. Trends in Food Science & Technology, 2004, 15: 137-142.
- [11] LOFTSSON T, MASSON M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2001, 225: 15-30.
- [12] DUCHENE D, WOUESSIDJEWE D, PONCHEL G. Cyclodextrins and carrier systems[J]. Journal of Controlled Release, 1999, 62: 263-268.
- [13] 张树政. 酶制剂工业[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 545-549.
- [14] 陈国亮, 柴华丽, 杨琦. α -环糊精测定方法的研究[J]. 化学试剂, 1990, 12(5): 308-310.
- [15] 曹新志, 金征宇. 环糊精葡萄糖基转移酶高产菌株的快速筛选[J]. 中国粮油学报, 2003, 18(6): 53-55.

specific anti-LPS IgY produced from hens.

Key words: *E. coli* 0157:H7; preventing; endotoxin; egg yolk antibody; preparation

中图分类号: 0939.91; 0503

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-01164-04

大肠杆菌 0157:H7 是一种食源性人畜共患病源菌, 可致腹泻、出血性结肠炎及溶血性尿毒综合征等, 主要通过污染的牛肉、牛奶等食品传播感染。该病菌自暴发流行以来, 世界各国相继研究出多种抗感染方法, 但存在制备技术要求高, 特异性结合反应强度低等缺陷。我国学者柯岩等^[1]认为, 对细菌性感染的免疫保护及治疗, 多克隆抗体具有更高的亲和力。相比动物抗血清, 鸡卵黄抗体在此方面更具有结合活性强、易大量制备等优点^[2]。为此, 本文通过研究 *E. coli* 0157:H7 灭活菌体、脂多糖(LPS)、O-特异性多糖侧链(O-SP)三种不同抗原鸡卵黄抗体的制备特点, 探索应用特异性鸡卵黄抗体为预防大肠杆菌 0157:H7 的感染传播提供一种易于推广使用的免疫预防及治疗方法, 还可在此实验基础之上进一步探索应用特异性抗内毒素鸡卵黄抗体检测大肠杆菌 0157:H7 的方法, 进而实现对该食源性病原菌的有效检测与防治。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

EHEC 0157:H7 EDL 933株 中国疾病预防控制中心馈赠; 免疫用鸡为 3 个月临产蛋母鸡, 状态良好, 生长整齐, 重约 1.2 kg, 前期无病史, 购自咸阳郊区鸡场。

兔抗鸡 IgG-HRP、兔抗鸡 IgG、标准鸡 IgG 北京经科生物制品公司; DEAE-Sephadex A-50; 不完全弗氏佐剂 Sigma 公司; 透析袋(截流分子量 8000~10000)华美公司; 核酸蛋白检测仪 上海康华生化仪器制造厂; Well scan-MK-3 酶标仪 荷兰; 酶标板 华美公司; 垂直电泳仪(Hoefer mini VE); 超滤(Millipore 超滤膜截留分子量为 5 万); 台式高速冷冻离心机 GL20A 湖南赛特湘仪公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫原的制备

以水煮法灭活 *E. coli* 0157:H7 制备菌体抗原^[3]。

采用热酚水法制备 *E. coli* 0157:H7 内毒素抗原: 活化菌株并鉴定 挑取单菌落培养 离心收集菌体 无热源水悬浮并反复冻融 3 次 与 90% 苯酚加热至 68℃ 后混合 搅拌 30 min 冰浴至 2℃ 离心(4℃, 3000 × g, 20 min)

水相装于透析袋中透析 50% 聚乙二醇 20000 浓缩加 Dnase、Rnase 37℃ 下酶解 100℃ 水浴 10 min 冷却至室温后离心 用丙酮沉淀上清后获得 LPS 抗原。

酸解 LPS 制得 O-SP: LPS 溶于 1.5% 醋酸溶液中 100℃ 水浴 30 min 离心弃沉淀(类脂) 4 次透析 24 h 50% 聚乙二醇浓缩得 O-SP 抗原。

1.2.2 鸡体免疫

分别用灭活后 *E. coli* 0157:H7 菌体($10^9 \sim 10^{10}$ CFU/ml), 不同浓度内毒素(LPS 含量分别为 600、1200、2000 μg/ml) 及 O-SP 与等量不完全弗氏佐剂(incomplete Freund's adjuvant)混合, 充分乳化后每只鸡注射 1 ml, 分别于双翅下及胸前 4 点皮下注射。首次免疫后, 每间隔 2 w 加强免疫一次, 共免疫 4 次, 同时设阴性对照鸡一组。首免后 10 d 开始收集鸡蛋, 置 4℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 抗体产生效价测定

采用间接 ELISA 法进行。将灭活后 *E. coli* 0157:H7 菌体用 CB 稀释成 $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml 后包被酶标板; 1% BSA-PBST 封闭; 待测样经倍比稀释后按 100 μl/孔加入; 未经免疫鸡蛋样做阴性对照; 酶标兔抗鸡 IgG 工作浓度为 1:400; TMB 底物溶液显色, 2 mol/L 硫酸终止反应。酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光值(A_{450}), 以吸光值为阴性孔二倍的稀释度作为检测效价。

1.2.4 IgY 分离纯化

鸡蛋破壳分离出蛋黄 与蒸馏水按 1:9 稀释后搅拌 30 min 调 pH 至 5.2~5.3 后, 4℃ 静置 30 min 以上 装于无菌包装袋中 -20℃ 冷冻过夜 解冻后经 0.45 μm 微滤膜微滤(3% 硅藻土助滤) 超滤浓缩 45% 饱和硫酸铵沉淀 离心分离, 沉淀用蒸馏水溶解 透析 DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析阶段洗脱分离纯化(0.05 mol/L 离子强度 pH 7.0 THS 平衡上样, 0.135 mol/L 洗脱杂蛋白, 0.185 mol/L 洗脱分离纯化出 IgY)。

1.2.5 抗体纯度鉴定

SDS-PAGE 测定。分离胶浓度 8%, 浓缩胶浓度 3%, 恒压 160 V 电泳, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 标准鸡 IgG 做对照。

1.2.6 抗体活性测定

双向免疫扩散法测定。中心孔加入兔抗鸡 IgG, 鸡标准 IgG 做阳性对照。

2 结果与分析

2.1 免疫原的制备效果

前期实验^[3]证实经水煮 15 min 后制得的菌体抗原具有很好的抗原特性。应用热酚水法制备的 EHEC 0157:H7

LPS 抗原产率较高(约 0.5%), 纯度较好, 具鲎试剂凝集活性。酸解 LPS 后获得 O-SP 抗原, 经检测多糖含量相对较高。

2.2 不同抗原的鸡体免疫效果

几种不同抗原免疫鸡体后, 间接 ELISA 监测抗体产生过程, 免疫应答效果如图 1 所示。结合表 1 可以看出 *E. coli* 0157:H7、LPS、O-SP 三种抗原在合适浓度下, 均可刺激鸡体产生高效价抗体。浓度为 1200 $\mu\text{g/ml}$ 的内毒素抗原, O-SP 及 *E. coli* 0157:H7 在二免后抗体效价开始上升, 并于 38d 左右达最高值, 分别为 1:32000、1:40000、1:32000, 显示出了较好的免疫原性, 以 O-SP 抗原产生效价最高, 维持时间也较长, 同时得出, 浓度为 1200 $\mu\text{g/ml}$ 为该大肠杆菌内毒素抗原最佳鸡体免疫剂量。2000 $\mu\text{g/ml}$ LPS 抗原刺激鸡体产生抗体水平较低。

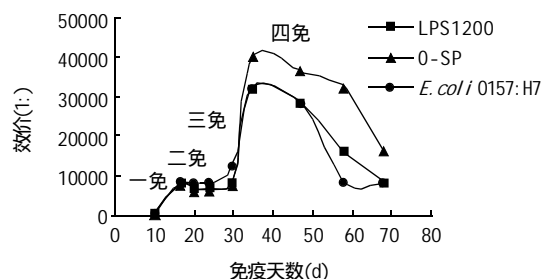


图1 不同抗原鸡免疫产生抗体曲线

Fig.1 Changes of antibody levels with different antigens stimulating hen

2.3 IgY 纯化效果鉴定

根据本实验室采用 DEAE-Sephadex A-50 离子交换层析梯度洗脱结果, 调整离子强度进行阶段洗脱, 用核酸蛋白检测仪检测如图 2 所示。经电泳检测后发现, 离子强度为 0.08、0.10、0.12 mol/L 的洗脱样均有一条远离鸡标准 IgG 等位线的小分子蛋白带(非 IgY), 而 0.14、0.16、0.18 及 0.20 mol/L 的洗脱样均显示一条与鸡标准 IgG 处于同一水平线的蛋白带, 且其颜色逐渐变淡, 其中 0.14 mol/L 泳道上还略显一条与前者同样的条带。实验过程中, 通过比较多步研究结果, 在 pH 7.0 THS 环境下, 用 0.135 mol/L 离子强度上样平衡后, 用 0.185 mol/L 洗脱即可实现纯化 IgY。

2.4 IgY 活性测定

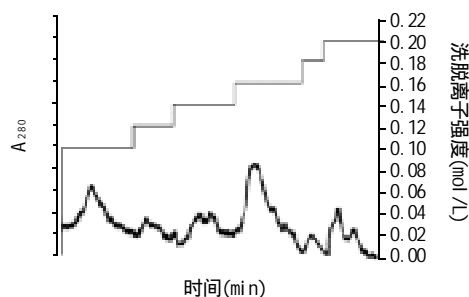


图2 不同离子强度阶段洗脱色谱图

Fig.2 Procedure of exchanging with different ion intensity

纯化后 IgY 适当浓缩后经双扩检测有明显沉淀线, 可见该纯化步骤对其活性损失影响较小, 可实现特异性抗内毒素 IgY 的大量制备。

3 讨论

大肠杆菌 0157:H7 是肠出血性大肠杆菌(enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)的主要血清型, 属革兰氏阴性菌, 该菌体存在多种抗原(O 抗原、H 抗原和 K 抗原等)。O 抗原即脂多糖抗原(lipopolysaccharide, LPS), 也称细菌内毒素(endotoxin), 主要与抗原性、致病性及对噬菌体的敏感性有关, 可作用于抗原提呈细胞促使其产生多种细胞因子和炎症介质, 使机体发热、腹泻、血压的降低, 乃至感染性休克等多种病变。它主要由脂质部分(Lipid A)、核心寡聚糖和 O-特异性多糖侧链(O-SPS)三部分构成, O-特异性多糖侧链由重复的寡糖单位组成, 位于核心多糖外侧, 具有种属特异性。

实验发现, 用文中方法制备的全菌、脂多糖及 O-SP 抗原均能刺激鸡体产生较好的免疫应答反应, 其中以 O-SP 抗原产生鸡卵黄抗体效价最高, 表现出强的抗原特性, 所产生的抗体与相应抗原的结合活性也较强。经过 DEAE-Sephadex A-50 一步洗脱实现鸡卵黄抗体的快速纯化操作, 可制备出高纯度, 高活性 IgY, 为大肠杆菌 0157:H7 的感染防治提供了可靠的保证。由于抗 LPS 抗体能够阻止大肠杆菌 0157 对人肠上皮细胞的粘附^[4], 有良好的免疫保护及治疗作用。据此, 我们选取制备了三种不同抗原, 比较研究不同抗原刺激产生的鸡卵黄抗体的结合活性, 从而选出一种结合能力强, 特异性高的鸡卵抗体用于大肠杆菌 0157:H7 的抗感染防治。在此实验基础之上, 可进一步探讨应用特异性抗 *E. coli* 0157:

表1 不同抗原鸡体免疫应答 IgY 产生效价间接 ELISA 测定结果

Table 1 Titer of IgY against several different antigens detected by indirect-ELISA

天数(d)	10	17	20	24	30	35	47	58	68
(600 $\mu\text{g/ml}$)	1:25600	1:4096	1:6400	1:8000	1:12000	1:28000	1:25600	1:16000	1:16000
(1200 $\mu\text{g/ml}$)	1:384	1:8000	1:6400	1:6400	1:8000	1:32000	1:28000	1:16000	1:8000
(2000 $\mu\text{g/ml}$)	1:288	1:8000	1:6400	1:8000	1:12000	1:4000	1:6400	1:8000	1:4000
O-SP	1:160	1:8192	1:6400	1:6400	1:8000	1:40000	1:36000	1:32000	1:16000
<i>E. coli</i> 0157:H7	1:256	1:8192	1:8000	1:8000	1:12000	1:32000	1:28000	1:8000	1:8000

山茱萸中 - 葡萄糖苷酶抑制活性因子的筛选(I)

马庆一¹, 陈丽华^{1,2}, 杨海延¹, 王庆玲¹

(1. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院 河南 郑州 450002; 2. 平顶山学院化学与化工学院 河南 平顶山 467002)

摘 要: 从山茱萸中提取、分离并部分纯化得到水粗提物以及多糖、鞣质、皂甙、有机酸等组分。它们的得率分别为 9.60%、2.00%、2.40%、0.75%、4.10%。酶反应动力学检测结果表明, 除有机酸外各组分均对 - 葡萄糖苷酶有抑制作用, 其中皂甙和鞣质效果较佳, 优于两倍量拜堂平。实验证实了山茱萸是天然 - 葡萄糖苷酶抑制剂的良好来源, 而山茱萸鞣质和皂甙是降糖功能因子的良好候选物。

关键词: 山茱萸; - 葡萄糖苷酶抑制剂; 皂甙; 鞣质; 血糖

Screening -Glucosidase Inhibitors from *Cornus officinalis*(I)

MA Qing-yi¹, CHEN Li-hua^{1,2}, YANG Hai-yan¹, WANG Qing-ling¹

(1. Zhengzhou Institute of Light Industry, College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou 450002, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Pingdingshan University, Pingdingshan 467002, China)

Abstract: In this experiment the crude extracts and the components of polysaccharides, tannins, saponins and organic acids were obtained from *Cornus officinalis* by extraction, isolation and partial purification with yields respectively 9.60%, 2.00%, 2.40%, 0.75%, 4.10%. The results of enzymatic kinetics assays showed that all of the components have inhibitory activities against -glucosidase except organic acids. Saponins and tannins showed better inhibition effect than double concentration of Glucobay. The experiment confirmed that *Cornus officinalis* is a good source of -glucosidase inhibitors and *Cornus officinalis* saponins and tannins may become promising candidates for blood sugar reducing function factors.

Key words: *Cornus officinalis*; -glucosidase inhibitor; saponin; tannin; blood sugar

中图分类号: TS218

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0167-04

糖尿病是严重威胁人类健康的慢性病之一, 其发病率仅次于心脑血管疾病、癌症而居第三位^[1]。近年研究发现, 餐后高血糖可能加重糖尿病病情并导致严重并发

症^[2-3]。因此, 减轻餐后高血糖在防治糖尿病, 其中特别是 型上具有重要作用。

食物中碳水化合物等在唾液和胰 - 淀粉酶作用下先

收稿日期: 2005-10-30

作者简介: 马庆一(1944-), 男, 教授, 博士后, 研究方向为保健食品功能因子和食品添加剂。

H7 脂多糖鸡卵黄抗体实现对大肠杆菌 O157: H7 的检测。

E. coli O157: H7 的感染防治及检测一直是国内外的研究热点, 相继研究出的多种抗感染方法, 多存在制备技术要求高、特异性结合反应强度低、成本高等缺陷, 难以推广使用。本文通过制备特异性鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 替代抗血清一定程度上解决了此方面的缺憾。

参考文献:

- [1] 柯岩, 安云庆. 大肠杆菌脂多糖核心型及其检测方法[J]. 微生物学免疫学进展. 2000, 28(4): 90-94.
- [2] PANTOJA L D, VINUESA, J L, GONZALEZ D B, et al. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2000, 11(6): 657-73.
- [3] 宋宏新, 马娜, 程军. 抗大肠杆菌 O157 鸡卵黄抗体的初步研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21(5): 407-409.
- [4] PATON A W, VOSS E, MANNING P A, et al. Antibodies to lipopolysaccharide block adherence of *Shiga toxin-producing Escherichia coli* to human intestinal epithelial (Henle 407) cells[J]. Microb Pathog, 1998(24): 57-63.