

率。本研究表明,多糖不仅是生物体生命活动中的能量与结构物质,而且具有抑制油脂氧化,清除羟基自由和超氧阴离子自由基的功能,从而为山茱萸多糖药物与功能性食品的开发提供了理论依据。

参考文献:

[1] 王浴铭,杨云,刘翠萍.山茱萸临床应用与药理作用[J].河南中医药学刊,1999,14(1):61-62.

- [2] 祝美云,黄忠民,杨天保等.山茱萸保健饮料的研制[J].郑州轻工业学院学报,1998,13(2):66-70.
- [3] 董群,郑丽伊,方积年.改良的苯酚-硫酸法测定多糖和寡糖含量的研究[J].中国药理学杂志,1996,31(9):550-553.
- [4] 秦德安,苏丹,王小玲.橙皮苷对羟自由基的清除作用[J].中国药理学杂志,1996,31(7):396.
- [5] 任岱,王一凡,姚银秀等.芦荟对超氧阴离子自由基链式反应的影响[J].中国现代医学杂志,1999,9(6):22-24.

抗龋齿蛋黄抗体的制备及功能性研究

杨严俊, 徐榕榕

(江南大学食品学院, 无锡 214036)

摘 要: 本论文系统地研究了抗龋齿蛋黄抗体的制备方法,并对其功能性进行了实验。实验结果显示经变异链球菌免疫后可得到高活性蛋黄抗体。体外模拟实验表明经变异链球菌免疫的蛋黄抗体确实具有抗牙菌斑形成的能力,从而具备防龋齿的功效。

关键词: 蛋黄抗体; 变异链球菌; 免疫; 抗牙菌斑

Abstract: In this paper, after immunization of hen with *Streptococcus mutans*, the isolation and determination of yolk antibody were studied systematically. The high activity of yolk antibody was obtained after chicken immunization. Preimmune chicken yolk antibody against *S. mutans* was shown anti-plaque activity in vivo. The result indicated that yolk antibody against *S. mutans* might have a protective effect against dental caries caused by *S. mutans*.

Key words: yolk antibody; *Streptococcus mutans*; immune; anti-plaque

中图分类号: Q511

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2003)07-0137-04

龋菌在今天已成为人类最常见的疾病之一^[1], 1960年Fitzgerald等人证实了变异链球菌为龋齿的病原菌^[2]。许多科学家都建议采用被动免疫法来预防龋齿^[3~5]。Otake发现抗变异链球菌蛋黄抗体可减少牙菌斑的形成和龋齿的发生^[6]。日本科学家则用变异链球菌的非水溶性葡聚糖复合物喂母鸡,并从中所产的蛋黄中制得抗体。该抗体可阻止变异链球菌粘附在大鼠牙齿表面,预防龋齿的发生。而人体试验也证实口含该蛋黄抗体,可抑制变异链球菌活性,从而防止龋齿^[7]。Hatta等也发现:抗变异链球菌蛋黄抗体抑制变异链球菌粘附于唾液包裹的羟磷灰石龋上的效果达59.2%,而对照组未免疫母鸡的蛋黄抗体只能抑制8.2%;同时人体实验表明抗变异链球菌蛋黄抗体可大大减少唾液内变异链球菌的百分比。因此,可用于作为控制变异链球菌在人口腔中繁殖的有效方法^[8]。

由于蛋黄抗体与其他动物抗体相比,具有资源丰富、抗体活性高、成本低廉等诸多优势,因此是制备抗龋齿抗体的理想材料。同时对提高我国人民特别是儿童的健康水平也具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

迪卡蛋鸡 自养; 变异链球菌(32404) 中国医学细菌保存管理中心; 酶联试剂(Rabbit Anti-IgY HRP) Sigma公司; 底物 四甲基联苯胺(TMB), 上海生化试剂公司; M516酶联免疫测定仪 上海第三分析仪器厂; DYY-III电泳仪 北京六一仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 变异链球菌液的制备

收稿日期: 2002-11-16

作者简介: 杨严俊(1965-), 男, 博士, 副教授。

将变异链球菌(32404)接种于MRS培养基中, 厌氧条件下, 37℃培养24h, 离心得到菌体。磷酸盐氯化钠缓冲液(PBS)洗涤离心(3000 r/min, 15min), 重复三次。再加入0.4%甲醛溶液灭活, 再用PBS缓冲液洗涤三次, 待用。

MRS培养基配方(1000ml) 蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, 柠檬酸三铵 2g, 葡萄糖 5g, $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58g, 牛肉膏 10g, K_2HPO_4 2g, 乙酸钠 5g, 吐温 80 1ml, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25g。

1.2.2 蛋鸡的免疫

取所需体积的抗原(变异链球菌液浓度 10^8 CFU/ml), 加入等体积福氏完全或不完全佐剂(福氏不完全佐剂成份为羊毛脂:液体石蜡=1:2, 在福氏不完全佐剂中再加入3mg/ml卡介苗即为福氏完全佐剂)充分乳化, 即得到福氏完全免疫试剂或不完全免疫试剂。然后于蛋鸡翼下、腹部四点肌肉注射, 每点0.25ml, 共1.0ml福氏完全试剂。然后分别于首次注射后的第7、28、90d进行三次强化注射, 方法同第一次, 试剂则换为福氏不完全试剂。

1.2.3 酶联免疫吸附法(ELISA)测定蛋黄抗体活性^[9]

溶液配制: 配制溶液如表1所示。

实验方法如下所示:

破壁大肠杆菌液(相当于 10^8 CFU/ml) 每孔包被100 μ l

↓ 4℃吸附过夜

洗涤液洗涤3次, 每次3min

↓

每孔加入100 μ l 封闭液

↓ 37℃温育1h

洗涤液洗涤3次, 每次3min

↓

每孔加入100 μ l 待测样品

↓ 37℃温育2h

洗涤液洗涤3次, 每次3min

↓

每孔加100 μ l 酶联试剂

↓ 37℃温育1h

洗涤液洗涤3次, 每次3min

↓

加底物80 μ l

↓ 37℃温育15~20min

加终止剂50 μ l

↓

酶联仪比色

1.2.4 温度、pH对蛋黄抗体活性的影响

蛋黄抗体溶于pH7.4, 0.1mol/L PBS缓冲液, 浓度均为0.2mg/ml。在不同温度条件下水浴保温30min, 然后用ELISA方法测其活性。

将蛋黄抗体样品溶解于不同pH梯度(pH2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0)的0.05mol/L Tris-HCl缓冲液中, 于20、37、60℃反应3h, 用2mol/L Tris溶液中和, 测其活性。

1.2.5 蛋黄抗体抑制变异链球菌粘附实验

菌种活化后, 取菌液(10^8 CFU)0.5ml加入10ml培养液中稀释待用。不同浓度的蛋黄抗体溶液用0.22 μ m微滤膜过滤除菌。

在灭菌试管中分别加入2.0ml 稀释菌液和2.0ml不同浓度的蛋黄抗体溶液, 并充分混合。对照管则用2.0ml 生理盐水代替蛋黄抗体溶液作为对照。然后均置于37℃培养箱中培养2h。再取0.5ml 菌液和蛋黄抗体的混合液(对照管为0.5ml 菌液和生理盐水的混合液)分别加入含10ml 培养基的试管中, 放入37℃培养箱中培养, 在不同时间段内进行观察, 最后倒去培养液后观察实验结果。

2 结果与分析

2.1 蛋鸡免疫实验

实验组经过第一次注射后, 即开始用间接ELISA方法来检测鸡蛋中抗变异链球菌蛋黄抗体的生物活

表1 ELISA分析所用试剂

| 包被缓冲液 | 0.05mol/L pH9.6碳酸盐缓冲液 |
|-------|---|
| 包被抗原 | 破壁变异链球菌液用包被缓冲液稀释到相当于 10^8 CFU/ml |
| 稀释液 | 0.015mol/L pH7.4 PBS(含0.05% 吐温20)缓冲液 |
| 封闭液 | 0.01mol/L pH7.4 PBS(含0.05% 吐温20、1%BSA)缓冲液 |
| 洗涤液 | 0.02mol/L pH7.4 Tris-HCl(含0.05% 吐温20)缓冲液 |
| 酶联试剂 | 0.01mol/L pH7.4 PBS缓冲液1:1000稀释 |
| 底物 | TMB 200mg溶于二甲基亚砜20ml, -10℃保存, 用前取0.1ml 加入pH5.0磷酸盐-柠檬酸缓冲液7ml, 3% H_2O_2 90 μ l |
| 终止剂 | 2mol/L H_2SO_4 |

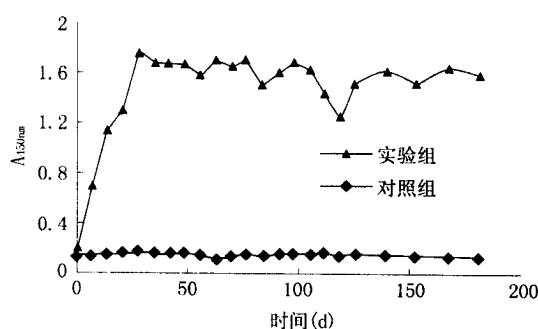


图1 蛋黄抗体抗变异链球菌的活性变化

性,历时6个月。从图1中可看出,在注射抗原后的第7d,便在蛋黄中检测到较高活性的变异链球菌。第二次加强注射后,蛋黄抗体的活性开始大幅度提高。第三次注射后其活性达到最高。并且可维持较长时间,至3个月后又有所下降。经第四次注射后,活性又恢复到原来水平,并又维持3个月。

2.2 免疫注射对蛋鸡产蛋率的影响

由于给蛋鸡免疫过程相当于一次感染过程,因此而产生的动物免疫应激反应对蛋鸡的生理活动有一定的影响。其产蛋率也有所下降,由注射前的88%猛然下降到注射后第1d的53%,然后又逐渐增加,至第五天才恢复至原来的水平(见图2)。而对照组产蛋率则几乎没有变化。

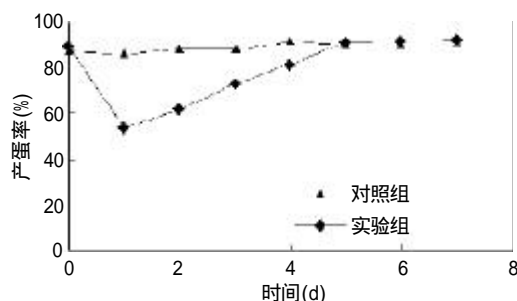


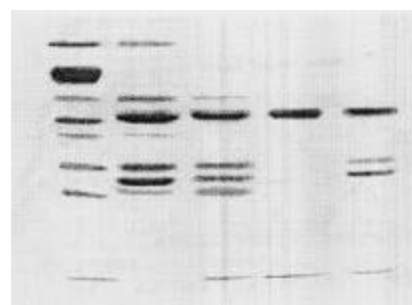
图2 免疫注射对蛋鸡产蛋率的影响

因此免疫注射给蛋鸡带来的短时间影响是非常显著的,但因其影响的时间每次只有5d左右,整个周期有15到20d会受到一定的影响。但因为蛋鸡的产蛋期长达300d左右。因此免疫对蛋鸡总产蛋率的影响非常小。

2.3 水稀释法结合超滤提取蛋黄抗体

鸡蛋黄除了含有蛋黄抗体外,还含有丰富的蛋白质及卵磷脂等物质,成分复杂,分离难度很大。一般都采用色谱分离,成本较高,不适合于工业化生产。本文采用水稀释法结合超滤分离提取蛋黄抗体^[9]。具有成本低,适合大规模工业化生产的特点。SDS-PAGE电泳实验证实:得到的最终产品中蛋黄抗体的含量高

达47%以上(见图3)。蛋黄抗体的总活性回收率也高达62%以上。



1-蛋黄蛋白质 2-絮凝澄清前的提取液 3-经絮凝澄清后的提取液
4-纯蛋黄抗体样品 5-蛋黄抗体产品

图3 蛋黄、水抽提液及蛋黄抗体产品的SDS-PAGE电泳图谱

2.4 蛋黄抗体的稳定性

2.4.1 温度对蛋黄抗体活性的影响

蛋黄抗体热稳定性的研究对于分离条件的选择、产品的保存及使用都有非常重要的意义。其结果如图4所示:在PBS缓冲液中的蛋黄抗体在55℃以下基本不变性,超过55℃开始变性,至70℃时丧失大部分的活性。但在55℃以下,其活性基本上没有变化。由于人体口腔温度只有37℃,因此不会对其活性造成影响。但在加工过程中则需小心控制温度,否则易造成失活。

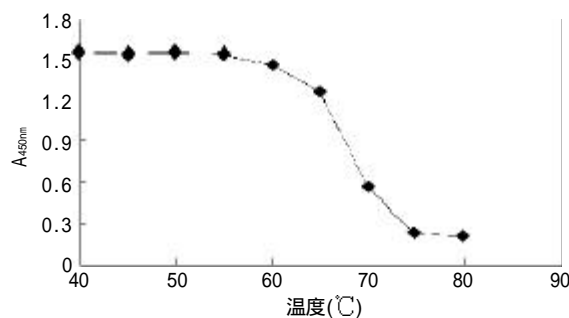


图4 温度对不同介质的蛋黄抗体活性的影响

2.4.2 pH对蛋黄抗体免疫活性的影响

环境介质主要是pH对蛋黄抗体活性有较大影响。由于蛋黄抗体具有类似酶的结构与功能,其抗原识别、结合的活性部位必须保持一定的空间结构才能发挥作用。而pH值的改变,可直接影响活性中心的空间构象,使得抗体与抗原分子的结合减弱或完全失活。本实验比较了在20、37、55℃条件下,蛋黄抗体对pH的敏感性,其实验结果如图5所示。

从图上明显可看出,pH对蛋黄抗体活性的影响随着温度的提高而变得敏感,在低温时,这种变化不太明显,20℃与37℃时,其活性在pH5以上时都

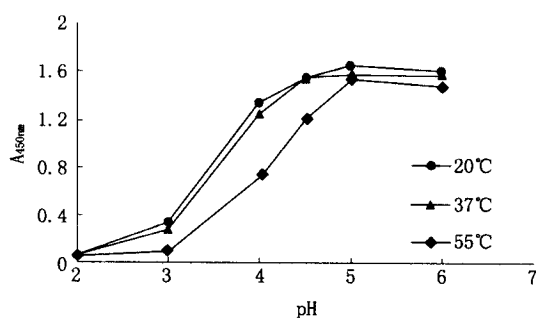


图5 pH对蛋黄抗体的影响

非常稳定。但在 pH 降至 3 时, 其活性就已损失了 80% 左右, 至 pH 2.0 时基本上全部失活。而在 55℃ 的环境中, pH 降至 4.5 时, 蛋黄抗体就开始失活, pH 降至 4.0 时, 活性已损失大约 60% 左右。pH 3.0 时已基本全部失活了。以上结果表明, 55℃ 时, 蛋黄抗体对 pH 的耐受性比 37℃ 时要下降 0.5~1 个 pH 单位, 这可能是在高温条件下, 构成活性中心的基团更易受 pH 的影响, 从而导致免疫活性丧失。

2.5 抗变异链球菌实验

表2 蛋黄抗体抗变异链球菌粘附试验

| 时间(h) | 组 别 | | | | |
|-------|-----|----------|----------|----------|----------|
| | 空白 | 0.1mg/ml | 0.3mg/ml | 1.0mg/ml | 3.0mg/ml |
| 5 | ++ | ++ | + | - | - |
| 16 | +++ | +++ | ++ | - | - |

注: +++ 表示粘壁程度最严重; ++ 表示粘壁程度较严重; + 表示有轻微粘壁; - 表示没有粘壁。

牙菌斑的形成是龋齿发生的主要原因, 因此蛋黄抗体抑制变异链球菌粘附的实验可以验证蛋黄抗体能否真正具有抗龋齿的功能。实验中发现: 在培养初期, 可见样品管无细菌贴壁现象, 而空白对照管可见细菌粘附在管壁上(见表2)。随着培养时间增长, 可见空白对照管粘壁细菌密度不断增加, 样品管壁出现粘附物。结束培养后分别将试管回复旋转 3~5 次, 倒去培养液后可见空白对照管壁的细菌贴壁紧密。而样品管的粘附物疏松, 很容易被摇下,

管壁表面较清洁。可见蛋黄抗体有明显地抑制变异链球菌在牙齿表面的生长并形成牙菌斑的作用, 从而达到防止龋齿的功效。

以上实验结果表明经变异链球菌免疫母鸡后可得到高活性的蛋黄抗体, 而蛋黄抗体抗变异链球菌粘附试验也证实抗变异链球菌蛋黄抗体确实具有抗牙菌斑形成的能力, 因而可作为防龋齿的功效因子。

参考文献:

- [1] Scherp H W. Dental caries: prospects for prevention [J]. Science, 1971, 173: 1193-1205.
- [2] Fitzgerald, Keyes, Carlsson. Dental plaque as a source of salivary streptococci [J]. Odontol Rev, 1967, 18 (2): 173-178.
- [3] Lehner T, Challacombe S J, Russel M W et al. Passive immunization by monoclonal antibodies against dental caries [J]. Infect Immun, 1978, 50: 796-799.
- [4] Lehner T, Russel M W, Caldwell J et al. Immunization with purified protein monoclonal antibody against dental caries in rhesus monkeys [J]. Infect Immun, 1981, 34: 407-415.
- [5] Michalek S M, McGhee J R. Effective immunity to dental caries: Passive transfer to rats antibodies to Streptococcus mutans elicits protein [J]. Infect Immun, 1977, 17: 644-650.
- [6] Otake S, Nishihara Y, Makimura M et al. Protection of rats against dental caries by passive immunization with hen-egg-yolk antibody (IgY) [J]. J Dent Res, 1991, 70(3): 162-166.
- [7] 八田一. 日本公开特许公报 4-71465. 1992.
- [8] Hatta H, Tsuda K, Ozeki M et al. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibody (IgY) specific to Streptococcus mutans [J]. Caries Res, 1997, 31(4): 268-274.
- [9] 唐莉莉等. 酶联免疫吸收技术用于蛋黄免疫球蛋白活性测定 [J]. 营养学报, 1999, 21(3): 318-321.

荟萃食品精华

探索科研动态