

文章编号: 1000-7423(2010)-02-0121-04

【论著】

日本血吸虫可溶性虫卵抗原经两种免疫途径获得的鸡卵黄抗体 IgY 动态观察

蔡玉春, 陈家旭*, 郭俭, 陈韶红, 童小妹, 田利光

【摘要】 目的 对比两种免疫途径产生抗日本血吸虫可溶性虫卵抗原(SEA)的特异性 IgY 抗体水平动态变化。方法 7 只新西兰兔感染日本血吸虫尾蚴(1 500/只)42 d 后解剖收集虫卵, 制备 SEA。将 SEA 分别经皮下和静脉注射免疫健康海蓝蛋鸡(3 只/组), 首次和第 2 次免疫间隔 2 周, 之后每次间隔 4 周, 共免疫 5 次, 50 μ g/(只·次)。取两组免疫前, 以及首次免疫后 2~18 周生产的鸡蛋, 用水稀释法粗提 IgY, ELISA 检测每 2 周 IgY 的动态变化。IgY 纯化试剂盒(EGGstract IgY Purification System)纯化静脉组首次免疫后 8~18 周的 IgY, 紫外吸收法检测抗体浓度, 琼脂糖双扩散法和 ELISA 检测 IgY 峰值水平的抗体效价, 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和蛋白质印迹(Western blotting)分析比较免疫前后抗体特异性。结果 静脉组和皮下组分别在首次免疫后 8 和 12 周 IgY 抗体水平达高峰, A_{492} 值分别为 1.28 和 0.78, 静脉组 IgY 水平至 18 周仍维持较高水平, 皮下组抗体水平达到峰值后逐渐下降。纯化后 IgY 浓度约为 6.5~9.0 mg/ml, 琼脂糖双扩散法和 ELISA 测得静脉注射组峰值水平抗体效价分别为 1:16 和 1:51 200。经 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析, 纯化后的 IgY 在相对分子质量(M_r)25 000 和 68 000 处各有一条清晰条带, 且免疫后 IgY 可与 SEA 发生特异性反应。结论 静脉注射法比皮下注射法能获得更高水平的鸡抗日本血吸虫 SEA 特异性 IgY 抗体, 且纯化后的 IgY 抗体具有较好的特异性。

【关键词】 日本血吸虫; 可溶性虫卵抗原; IgY; 免疫

中图分类号: R383.24

文献标识码: A

Dynamic Observation of Chicken Egg Yolk Antibodies against Soluble Egg Antigen of *Schistosoma japonicum* Obtained by Two Immunization Routes

CAI Yu-chun, CHEN Jia-xu*, GUO Jian, CHEN Shao-hong, TONG Xiao-mei, TIAN Li-guang

(National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Health; WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China)

【Abstract】 **Objective** To observe the dynamic changes of the specific chicken egg yolk antibodies (IgY) against soluble egg antigens (SEA) of *Schistosoma japonicum* by two immunization routes. **Methods** Seven New Zealand rabbits were infected with *S. japonicum* cercariae (1 500 per rabbit). After 42 days the rabbits were sacrificed to collect eggs and prepare SEA. Two groups each with 3 healthy hens were intravenously and subcutaneously immunized with 50 μ g SEA, respectively. All hens received five immunizations by the same dose of antigen, with 2-week interval for the first two doses, and 4-week interval for the rest doses. Hen eggs were collected at pre-immunization and every two weeks after the first immunization. Crude IgY was extracted from egg yolk by water dilution method, and were analyzed by SEA-based ELISA, then purified by using EGGstract IgY Purification System from the 8th to 18th week after the first immunization. IgY concentration was determined by A_{260}/A_{280} ratio. The expression of IgY was detected by agarose double diffusion method and SEA-based ELISA. The characteristics of IgY was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. **Results** The titer of IgY reached a peak at the 8th week in the intravenous group ($A_{492}=1.28$) and at the 12th week in the subcutaneous group ($A_{492}=0.78$), respectively, and maintained at a high level in the intravenous group until the 18th week after the first immunization. The concentration of purified IgY was about 6.5~9.0 mg/ml. Agarose double diffusion method and SEA-based ELISA demonstrated that the peak titer of IgY in the intravenous group was 1:16 and 1:51 200, respectively. SDS-PAGE demonstrated that IgY contained two major protein bands(M_r 25 000 and 68 000). IgY purified

基金项目: 国家科技支撑计划 (No. 2008BAI56B03)

作者单位: 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025

* 通讯作者, E-mail: chenjiayu@yahoo.com

from immunized egg yolk specifically reacted with SEA. **Conclusion** The intravenous method is superior than the subcutaneous injection method in obtaining a high level of egg yolk antibodies against SEA of *Schistosoma japonicum*, and the purified IgY shows better specificity.

【Key words】 *Schistosoma japonicum*; Soluble egg antigen; IgY; Immunization

Supported by the National Key Technology R&D Program (No. 2008BAI56B03)

* Corresponding author, E-mail: chenjiayu@yahoo.com

卵黄免疫球蛋白(egg yolk immunoglobulin, IgY)是禽类的一种特异抗体,在功能上同哺乳动物的IgG。鉴于IgY的产量大、稳定性好、不与类风湿因子(rheumatoid factor, RF)结合、不激活补体系统等独特的免疫学特性,以及动物种系发生学距离远等优点,是目前最有潜力的哺乳动物抗体替代品之一。在各种免疫诊断技术中具有广泛的应用前景^[1-3]。本研究将日本血吸虫可溶性抗原(SEA)通过两种不同方式免疫海蓝蛋鸡并获得抗SEA特异性IgY抗体,对产生IgY的过程进行动态观察,并对IgY的特性进行鉴定与分析。

材料与方法

1 实验动物

17周龄SPF级海蓝蛋鸡D系列祖鸡6只,购自上海家禽育种有限公司。新西兰兔7只,体重约2.5 kg,购自中科院上海实验动物中心。

2 主要试剂

福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂和辣根过氧化物酶标记兔抗鸡IgY的IgG(兔抗鸡HRP-IgG)均购自美国Sigma公司; IgY纯化试剂盒(EGGstract IgY Purification System)购自美国Promega公司; 蛋白质标志物(Page Ruler™ plus Prestained Protein Ladder)购自加拿大Fermentas公司。

3 SEA 抗原的制备

7只新西兰兔经腹部皮肤感染日本血吸虫尾蚴,每只1500条,感染后42 d解剖,从肝脏分离收集虫卵,冻干。取干卵称重,按1%的比例与生理盐水混合,置4℃冷浸4 d,期间每天摇2次,2 min/次。4 d后冰浴超声粉碎3次,3 min/次,每次间歇3 min。再如上述方法冷浸2 d,10 000×g 4℃离心30 min,取上清,收集分装,用考马斯亮蓝法(Bradford法)测定抗原蛋白浓度,-20℃保存备用^[4]。

4 抗原免疫鸡及鸡蛋的收集

将6只海蓝蛋鸡分为皮下组和静脉组,每组3只,将SEA与等体积福氏完全佐剂混合充分乳化后,

分别经背部皮下和双翅静脉注射,2周后将SEA与等体积不完全福氏佐剂加强免疫1次,之后每隔4周直接用抗原免疫,共3次,剂量均为50 μg/(只·次)。自免疫前至首次免疫后18周每2周收集1次鸡蛋,标记后4℃保存。免疫前鸡蛋作对照。

5 不同免疫方式 IgY 动态变化比较

取皮下组和静脉组免疫后2~18周的鸡蛋,每组每次4枚,用卵黄分离器分离卵黄,双蒸水清洗后量筒计量,将双蒸水用0.1 mol/L盐酸调为pH 5.2,按卵黄和水1:8稀释,常温搅拌2.5 h后,-20℃放置3 h,再于4℃缓慢融解,5 000×g 4℃离心25 min,取上清即得IgY粗提液。SEA 1 μg/孔包板过夜,PBST洗涤3次,1%小牛血清(BSA)封闭1 h,卵黄粗提液100 μl/孔,37℃孵育1 h,洗涤3次后,加入兔抗鸡HRP-IgG(1:20 000)100 μl/孔,37℃孵育1 h,洗涤后,邻苯二胺(OPD)显色10 min。2 mol/L硫酸终止反应,酶联反应检测仪(Multiskan MK3,美国Thermo公司)测吸光度(A₄₉₂值)。

6 IgY 纯化及鉴定

分别取免疫前、静脉组首次免疫后8~18周和皮下组首次免疫后12周的鸡蛋,每2周一批鸡蛋作为一个样本组。用卵黄分离器分离卵黄,纱布去除剩余卵清,按IgY纯化试剂盒说明书进行纯化,加PBS至原卵黄液体积,-20℃保存备用。

6.1 纯化IgY浓度测定 紫外吸收法检测纯化IgY抗体浓度。PBS作参比,将待测样品分别用PBS稀释50倍和100倍后,分光光度仪测A₂₆₀和A₂₈₀值,按公式C(mg/ml)=(A₂₈₀×1.45)-(A₂₆₀×0.74)计算蛋白浓度。

6.2 琼脂糖双扩散法检测IgY 100 ml生理盐水中加入1 g琼脂粉煮沸溶化,每片载玻片上滴4.2 ml,共5片。置室温冷却后打梅花孔,过火封底,冷却后加样,中心孔加SEA抗原液20 μl(浓度为2.0 mg/ml),周围孔加静脉组首次免疫后8周的纯化IgY,分别为原浓度以及2、4、8、16和32倍稀释液各20 μl,置于湿盒中,室温48 h后观察结果。

6.3 间接ELISA法测定特异IgY抗体效价 SEA抗原液1 μg/孔,4℃包板过夜,PBST洗涤3次,1%

BSA封闭1 h, 洗涤3次后, 分别取静脉组首次免疫后8周和皮下组首次免疫后12周纯化IgY的倍比稀释液(1:800, 1:1 600, ……, 1:512 000), 100 μl/孔, 37 °C孵育1 h, 洗涤3次后, 加入兔抗鸡HRP-IgG(1:20 000) 100 μl/孔, 37 °C孵育1 h, 洗涤后加OPD显色10 min, 2 mol/L硫酸终止反应, 在酶标仪上读取A₄₉₂值。PBS作空白对照, 免疫前IgY为阴性对照。判定检测孔A₄₉₂值> [阴性对照平均值+3×标准差]为阳性结果。

6.4 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和蛋白质印迹(Western blotting)分析 还原性SDS-PAGE分析静脉组首次免疫后8周纯化前后的IgY抗体, 浓缩胶为5%, 分离胶为8%。

SEA经SDS-PAGE电泳后转移至硝酸纤维素膜(NC膜), NC膜用3% BSA 4 °C封闭过夜, 一抗为静脉组免疫后8周纯化IgY抗体(1:500), 免疫前提纯的IgY抗体作为对照, 二抗为兔抗鸡HRP-IgG(1:1 000), 4-氯-1-萘酚和3,3'-二氨基联苯胺等量混合后加30%过氧化氢显色。

结 果

1 不同免疫方式获得的IgY抗体动态变化

皮下组免疫后IgY水平持续升高, 至首次免疫后12周达到最高值, A₄₉₂值为0.78, 后缓慢下降, 但A₄₉₂值仍维持在0.5~0.7。静脉组首次免疫后2周IgY的A₄₉₂值即明显升高, 高于皮下组, 免疫后4周略有下降, 随后快速升高, 至免疫后8周升至最高值, A₄₉₂值为1.28, 之后维持在相对较高水平直至免疫后18周实验结束(图1)。

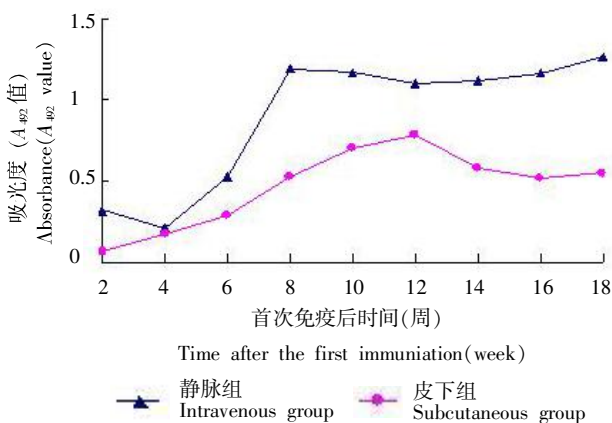


图1 两种免疫方式获得的IgY抗体水平变化曲线
Fig.1 Change in level of IgY obtained from two immunization routes

2 纯化后IgY抗体浓度

纯化后的IgY原蛋白浓度为6.5~9.0 mg/ml, 每

枚鸡蛋可获IgY抗体约78~96 mg。

3 琼脂糖双扩散试验结果

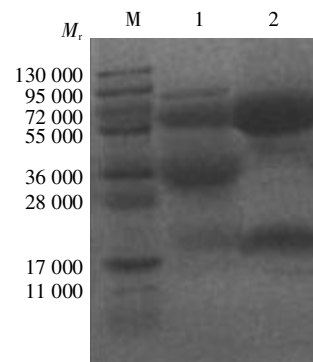
结果显示, 原浓度和1:2稀释的纯化IgY与SEA的反应沉淀线于反应后12 h即出现, 36 h反应加强, 1:16稀释的IgY与SEA的反应沉淀线于反应后36 h出现, 反应后48 h内未观察到1:32稀释的IgY的反应沉淀线。

4 IgY抗体效价测定结果

经间接ELISA测定, 静脉组首次免疫后8周的IgY抗体效价为1:51 200, 皮下组首次免疫后12周IgY抗体效价为1:25 600。

5 SDS-PAGE和Western blotting结果

还原性SDS-PAGE结果显示, 静脉组首次免疫后8周的纯化IgY分别在相对分子质量(M_r) 25 000和68 000处各有一条清晰条带。而未纯化的IgY除2条主带外还有2条杂带, 分别位于M_r 36 000和95 000处(图2)。



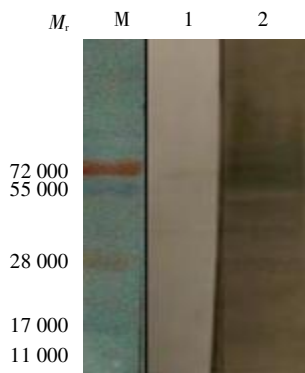
M: 蛋白标志物, 1: 未提纯的IgY, 2: 纯化后的IgY。
M: Protein marker, 1: IgY before purification, 2: Purified IgY.

图2 纯化前后IgY的还原型SDS-PAGE分析
Fig.2 Reduced SDS-PAGE analysis of IgY before and after purification

Western blotting结果显示, SEA仅可被免疫后的IgY识别, 反应条带主要集中在M_r 55 000~72 000范围内, 在M_r 11 000~55 000之间也有4条较清晰的反应条带。免疫前IgY未观察到反应条带(图3)。

讨 论

本研究结果显示, 日本血吸虫SEA静脉注射免疫海蓝蛋鸡后2周即有特异性IgY抗体产生, 而免疫兔等哺乳动物一般需要4~6周^[4], 表明鸡可能较哺乳动物更容易产生抗体。而且许多研究者认为用少量



M: 蛋白标志物, 1: 免疫前 IgY, 2: 静脉组免疫后 8 周 IgY。
M: Protein marker, 1: IgY from unimmunized egg yolk, 2: IgY from eggs in intravenous group at 8 weeks after first immunization.

图 3 免疫前后 IgY 的 Western blotting 分析

Fig.3 Western blotting analysis of IgY before and after immunization

抗原免疫鸡即可获得高滴度的抗体^[5]。本次用少量的抗原 (SEA 50 μg/只) 免疫海蓝蛋鸡即产生大量且特异性较好的抗日本血吸虫 IgY 抗体。另外鸡的饲养简单、花费少, 符合 3 个“R”[替代 (replacing)、减少 (reducing)、改善 (refining)] 的动物保护原则, 减少了对动物的伤害^[6-8]。

琼脂糖双扩散试验是定性和定量检测抗原和抗体的简便方法之一, 敏感性高^[4], 本研究用琼脂糖双扩散试验测得静脉组首次免疫后 8 周 IgY 抗体效价为 1:16, 而间接 ELISA 测定结果为 1:51 200, 说明所获 IgY 具有较高的效价。

经还原型 SDS-PAGE 分析, 纯化后的 IgY 在 M_r 68 000 和 25 000 处各有一条清晰条带, 与文献报道相符^[9]。但王成祖等^[10]的还原型 SDS-PAGE 分析表明, 裂解后的 IgY 有 7 个条带, 而本实验结果仅有 2 个条带, 可能与提纯方法不同有关。Western blotting 分析显示, IgY 与 SEA 可发生特异性反应, 与王成祖等^[10]的实验结论相同。

经过几十年的发展, 血吸虫病免疫诊断技术已具有较高的敏感性和特异性, 但多为基于循环抗体的检测, 而检测循环抗体不易区分既往感染和现症感染, 无法在现场应用时确定目标化疗人群, 且难以反映药物疗效, 不宜用作疗效考核的评价指标^[11]。因此近年来, 血吸虫病诊断专家认为解决个案“疗效考核”的可能替代途径是血吸虫循环抗原检测^[12]。循环抗原 (circulating antigen, CAg) 是存在于患者血液、唾液和尿液等体液中的血吸虫虫体代谢产物及分泌物, 检测患者血清或尿液中的循环抗原, 可评估虫荷和活性

感染, 可作为明确诊断的依据。基于循环抗原检测的方法很多, 但敏感性低、特异性不强, 因此寻找敏感性高、特异性强的循环抗原检测方法和技术是血吸虫病免疫诊断的要求。IgY 抗体是一种产量大、易于提取、稳定性好、具独特免疫学特性的新型抗体, 在发展日本血吸虫循环抗原的免疫诊断方面具有广阔前景。

参 考 文 献

[1] Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, *et al.* Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine[J]. *Altern Lab Anim*, 2005, 33(2): 129-154.

[2] Carlander D, Stalberg J, Larsson A. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective[J]. *Ups J Med Sci*, 1999, 104(3): 179-189.

[3] Malmarugan S, Raman M, Jaisree S, *et al.* Egg immunoglobulins—an alternative source of antibody for diagnosis of infectious bursal disease[J]. *Veterinarski Arhiv*, 2005, 75(1): 49-56.

[4] Zhu LP, Chen XQ. *Immunological Laboratory Methods*[M]. Beijing: People's Military Medical Press, 2000: 5-6, 76. (in Chinese) (朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 5-6, 76.)

[5] Shimizu M, Nagashima H, Hashimoto K, *et al.* Egg yolk antibody (IgY) stability in aqueous solution with high sugar concentrations[J]. *J Food Sci*, 1994, 59(4): 763-765.

[6] Kronvall G, Seal US, Svensson S, *et al.* Phylogenetic aspects of staphylococcal protein A—reactive serum globulins in birds and mammals[J]. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol*, 1974, 82(1): 12-18.

[7] Åkerström B, Brodin T, Reis K, *et al.* Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies[J]. *J Immunol*, 1985, 135(4): 2589-2592.

[8] Larsson A, Karlsson-Parra A, Sjoquist J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors[J]. *Clin Chem*, 1991, 37(3): 411-414.

[9] Dávalos-Pantoja L, Ortega-Vinuesa JL, Bastos-González D, *et al.* A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex comparison between chicken and rabbit antibody based particle enhanced[J]. *J Biomater Sci Polymer Edn*, 2000, 11(6): 657-673.

[10] Wang CZ, Mo HM, Cheng YL. Production and identification of chicken egg yolk antibodies against soluble egg antigen of *Schistosoma japonicum*[J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2007, 25(3): 193-197. (in Chinese) (王成祖, 莫红梅, 程喻力. 抗日本血吸虫 SEA 鸡卵黄抗体的制备与鉴定[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(3): 193-197.)

[11] Lu ZX, Xia CM. Progress of research on immunodiagnosis of schistosomiasis japonica[J]. *Chin J Schisto Control*, 2006, 18(4): 318-320. (in Chinese) (陆正贤, 夏超明. 日本血吸虫病免疫诊断研究进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2006, 18(4): 318-320.)

[12] Wu GL. Review and prospect on immunodiagnosis developments of schistosomiasis japonica in China[J]. *Chin J Parasitol Parasit Dis*, 2005, 23(5 Suppl): 323-328. (in Chinese) (吴观陵. 我国血吸虫病免疫诊断发展的回顾与展望[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(5 Suppl): 323-328.)

(收稿日期: 2009-10-14 编辑: 瞿麟平)