

抗大肠杆菌O₁₅₇鸡卵黄抗体的酶联免疫吸附试验

薛海燕, 李红心, 宋宏新

(陕西科技大学 生命科学与工程学院, 陕西 咸阳 712081)

[摘要] 以灭活大肠杆菌(*E. coli*)O₁₅₇为抗原免疫产蛋鸡获得抗*E. coli* O₁₅₇卵黄抗体(IgY), 建立了该抗体的间接酶联免疫吸附试验(ELISA)检测方法。并研究了包被温度和时间及不同卵黄前处理方法对ELISA检测的影响, 所获得的最佳检测条件为: 以浓度为 $10^8 \sim 10^9$ /mL的灭活*E. coli* O₁₅₇为抗原进行包被, 4℃包被19 h, 水稀释法对卵黄进行前处理, 然后检测其中的IgY效价。该方法简便可靠, 适于对大肠杆菌特异性抗体IgY的动态检测和批量检测。

[关键词] 大肠杆菌O₁₅₇; 卵黄抗体; 酶联免疫吸附试验

[中图分类号] R378.2; S852.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)11-0051-03

鸡卵黄免疫球蛋白(Immunoglobulin of Yolk, IgY)又称鸡卵黄抗体, 是母鸡血清中IgG类抗体移行至卵黄中积累而成的。该抗体具有产量高、成本低、不与类风湿因子结合、不激活哺乳动物补体系统等特点^[1], 故可应用于疾病的诊断与防治、兽医临床和食品安全检测等领域^[2]。*E. coli* O₁₅₇是一种病原性微生物, 目前检测*E. coli* O₁₅₇特异性抗体常用的免疫学方法有琼脂扩散法和免疫电泳法等^[3]。ELISA法检测抗体具有灵敏度高、特异性强等优点, 是当前应用最广、发展最快的技术。本试验用*E. coli* O₁₅₇免疫产蛋鸡, 获得了高免蛋, 建立了抗*E. coli* O₁₅₇特异性IgY的间接ELISA检测方法, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试验动物

120日龄健康产蛋鸡8只, 隔离饲养1周, 并进行血清学检测, 结果显示, 均无抗*E. coli* O₁₅₇抗体, 其中6只进行免疫, 另2只作为阴性对照。

1.2 试剂与仪器

试剂: 完全福氏佐剂与不完全福氏佐剂(美国Sigma公司); 标准鸡IgG及HRP酶标兔抗鸡IgG(北京新经科生物制品有限公司); BSA(上海化学试剂公司); TMB等其余试剂均为分析纯级。

仪器: 酶联免疫检测仪M K3(WELL SCAN 芬

兰); 聚苯乙烯酶标板(上海塑料三厂); 移液枪(德国Eppendorf公司)等。

1.3 方法

1.3.1 鸡免疫及特异性卵黄抗体的获得^[4] 大肠杆菌O₁₅₇(*Escherichia coli* O₁₅₇购自中国药品与生物制品检定所)在营养肉汤培养基中培养至浓度达 $10^9 \sim 10^{10}$ /mL, 煮沸15 min灭活, 与等量完全福氏佐剂混合, 对鸡进行首次免疫, 1 mL/只, 翼下多点注射。以后各次加强免疫以不完全福氏佐剂乳化, 最后一次不加佐剂。每次免疫间隔10 d, 共免疫4次。

1.3.2 间接ELISA程序^[5-6]及试验 间接ELISA程序如下: 以*E. coli* O₁₅₇为抗原稀释一定倍数, 100 μL包被酶标板, 置4℃过夜; PBS-Tween 20静置洗涤3次, 3 min/次; 再以100 μL BSA-PBST(体积分数1%)封闭40 min, 洗涤同上; 加入100 μL经倍比稀释的待测IgY, 37℃温育2 h; 洗涤后加100 μL一定稀释度的酶标兔抗鸡IgG, 37℃温育2 h; 洗涤后, 加入50 μL新鲜配制的四甲基联苯胺(TMB)底物溶液显色, 50 μL H₂SO₄(2 mol/L)终止反应; 在450 nm波长处测定吸光值(A₄₅₀)。间接ELISA测定*E. coli* O₁₅₇特异性IgY还需确定以下因素。

(1) 酶标抗体最佳工作浓度。用直接ELISA法, 以100 ng/mL标准鸡IgG包被酶标板, 酶标兔抗鸡IgG进行倍比稀释(1:40~1:640), 显色, 测定吸光度值。

· [收稿日期] 2005-11-14

[基金项目] 陕西科技大学自然科学基金项目(ZX05-25); 陕西科技大学创新团队项目(SUST-B12)

[作者简介] 薛海燕(1979-), 女, 陕西兴平人, 助教, 硕士, 主要从事抗体检测技术及生物大分子分离制备研究。

(2) *E. coli* O₁₅₇ 最适包被浓度。将 *E. coli* O₁₅₇ 培养 18 h, 离心收集菌体, 煮沸 15 min 灭活后, 用 0.01 mol/L 碳酸缓冲液 (pH 9.6) 稀释成 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ 和 10¹⁰/mL 并包被酶标板, 再分别加入稀释 10 倍体积的阴、阳性卵黄液和稀释 320 倍酶标抗体, 按 ELISA 法测定。

(3) 抗原最适包被时间和温度。将稀释成 10⁸~10⁹/mL 的 *E. coli* O₁₅₇ 抗原在不同温度下包被不同时间 (4℃下分别包被 15 和 19 h; 37℃下分别包被 2 和 6 h), 再加入 3 免后第 5 天阴、阳性卵黄待测液, 卵黄待测液分别进行 10 倍、10² 倍、10³ 倍、10⁴ 倍和 10⁵ 倍稀释, 按照 ELISA 流程测试, 以未包被的 *E. coli* O₁₅₇ 作为对照 (CK)。

1.3.3 卵黄前处理^[7] (1) 水稀释法。用 10 倍体积蒸馏水稀释卵黄原液, 调 pH 至 5.2~5.3, 4℃下静置过夜。4 500 r/min 离心 30 min, 取上清液待测。(2) 氯仿抽提法。用 2 倍体积生理盐水稀释, 加等体积氯仿搅拌混匀后, 37℃水浴加热 30 min, 4 000 r/min 离心 20 min, 取上清液待测。

2 结果与分析

2.1 酶标抗体最佳工作浓度的确定

酶标兔抗鸡 IgG 以 1:320 稀释时, A₄₅₀ 值为 1.182, 接近 1.0, 且此时空白对照值低。因此, 选择 1:320 为酶标抗体的最佳稀释度。

2.2 *E. coli* O₁₅₇ 最适包被浓度的确定

E. coli O₁₅₇ 为不同包被浓度时, 分别对阳性和阴性蛋黄提取液进行 ELISA 试验, 结果见图 1。由图 1 可见, 当 *E. coli* O₁₅₇ 的包被浓度为 10⁸/mL 或 10⁹/mL 时, 测得阳性卵黄提取液 A₄₅₀ 值相差不大;

但当其包被浓度低于 10⁸/mL 或高于 10⁹/mL 时, 阳性卵黄 A₄₅₀ 吸光度迅速降低; 且当用这 2 种浓度包被酶标板时, 所测定的阳性卵黄与阴性卵黄提取液的 A₄₅₀ 值相差较大, 为 1.2 左右, 阴性卵黄 A₄₅₀ < 0.34, 较低。为使非特异性干扰背景最小, 检测效果明显, 选择抗原最适包被浓度为 10⁸~10⁹/mL。

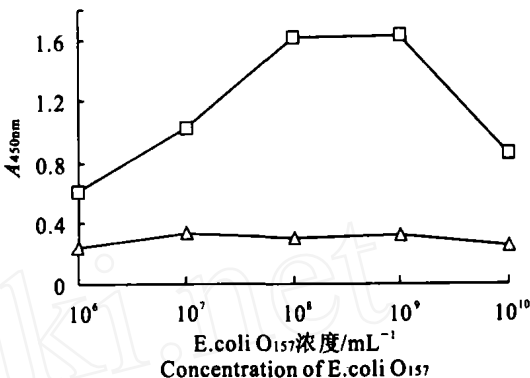


图 1 不同 *E. coli* O₁₅₇ 浓度与阴、阳性卵黄 A₄₅₀ 的变化关系
- △- . 阴性 A₄₅₀ 值; - □- . 阳性 A₄₅₀ 值
Fig. 1 Effect of different *E. coli* O₁₅₇ concentrations on A₄₅₀ value of the positive and negative
- △- . A₄₅₀ value of negative; - □- . A₄₅₀ value of positive

2.3 *E. coli* O₁₅₇ 抗原最适包被温度和时间的确定

以吸光度值大于等于阴性卵黄 (CK) 吸光度值 2.1 倍判断为阳性, 阳性卵黄待测液的最大稀释倍数为其效价。由表 1 可知, *E. coli* O₁₅₇ 在 4℃下包被 15 h 和 37℃下包被 2 h, 所测得的阳性卵黄抗体效价均较低, 前者约为 1:10², 后者为 1:10。而 4℃下包被 19 h 与 37℃下包被 6 h, 效价均为 1:10³。并且在 4℃下包被, 阴性 (CK) 吸光值较低, 显示结果更为明显, 可降低假阴性率, 结果更为准确、灵敏。因此, 选择 4℃包被 19 h 为最佳包被条件。

表 1 *E. coli* O₁₅₇ 在不同包被条件下的 ELISA 测定结果 (A₄₅₀)
Table 1 A₄₅₀ values of ELISA at different coating conditions

包被条件 Coating condition		卵黄待测液稀释倍数 Dilution of anti- <i>E. coli</i> O ₁₅₇ IgY					
温度/℃ Temperature	时间/h Time	1:10	1:10 ²	1:10 ³	1:10 ⁴	1:10 ⁵	CK
37	2	0.687	0.406	0.364	0.317	0.291	0.324
37	6	1.508	0.943	0.817	0.708	0.601	0.341
4	15	1.037	0.494	0.173	0.159	0.156	0.235
4	19	1.658	1.455	0.732	0.328	0.304	0.234

2.4 不同卵黄前处理方法对 ELISA 检测的影响

对同一天收集的高免蛋分离卵黄液后, 分别经水稀释和氯仿抽提处理, 上清液经倍比稀释后进行 ELISA 检测。由表 2 可知, 2 种方法处理后的卵黄抗体经检测, 效价均为 1:800。但从显色效果看, 水稀

释法的结果较明显; 氯仿法则因氯仿增加了酶标板的非特异性吸附, 影响了其显色效果。同时考虑到水稀释法的简单、无污染等优点, 故在 ELISA 检测中采用水稀释法对卵黄进行前处理。

表2 不同卵黄前处理方法的EL ISA 测定结果(A₄₅₀)

Table 2 A₄₅₀ values of EL ISA in egg yolk by different pre-treatments

稀释倍数 Dilution proportions	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1 600	1 : 3 200	阴性 Negative
水稀释法 Water-diluted	0.767	0.748	0.901	0.667	0.310	0.338
氯仿抽提 Chloroform extraction	0.801	0.790	0.712	0.635	0.617	0.322

注: 3 免后第 5 天效价测定。

Note: EL ISA of anti-*E. coli* O₁₅₇ IgY on the 5th days after the 3rd immunization

3 讨 论

影响间接EL ISA 检测结果的因素较多, 包被抗原、待测样品、酶标二抗及底物的浓度等都直接关系到EL ISA 方法的特异性和灵敏度。要建立大肠杆菌O₁₅₇ 特异性 IgY 的间接EL ISA 检测方法, 就必须对各项影响因素进行预试验, 获得最适检测条件并程序化, 以保证各批次试验结果的可比性。本研究通过试验建立了卵黄中抗大肠杆菌O₁₅₇ IgY 的间接EL ISA 检测方法, 确定的抗原最适包被条件是在 4℃下以浓度为 10⁸~ 10⁹/mL 的灭活 *E. coli* O₁₅₇ 包被

聚乙烯酶标板 19 h, 酶标抗体 1 : 320 稀释, 卵黄待测液经水稀释后检测, 可获得较佳结果。卵黄抗体与鸡血清抗体类似, 可采用琼脂扩散法^[8]或血凝抑制试验^[9]进行检测, 但前者需要大量的第二抗体血清, 试剂消耗量较大, 且结果判定时间长(24~ 72 h)、准确性差; 后者操作复杂, 影响因素多, 灵敏度不如EL ISA 检测。本研究建立的抗*E. coli* O₁₅₇ IgY 的EL ISA 方法具有试剂用量小、特异性强、灵敏度高、快速简便等优点, 适于对各类大肠杆菌特异性抗体的动态检测和批量检测, 同时也为大肠杆菌免疫机理研究及流行病学调查提供了可靠手段。

[参考文献]

[1] L asson A ,W eja k e r P E ,F o r s b e r g P O ,e t a l C h i c k e n a n t i b o d i e s : a t o o l t o a v o i d i n t e r f e r e n c e b y c o m p l e m e n t a c t i v a t i o n i n E L I S A [J] . J I m m u n o l M e t h o d s , 1992, 156(1): 79-83

[2] S t u m e r A M , D r i s c o l l D P , J a c k s o n M a t t h e w s D E . A q u a n t i t a t i v e i m m u n o a s s a y u s i n g c h i c k e n a n t i b o d i e s f o r d e t e c t i o n o f n a t i v e a n d r e c o m b i n a n t a l p h a - a m a d a t i n g e n z y m e [J] . J I m m u n o l M e t h o d s , 1992, 146(1): 105-110

[3] 姜昌富, 黄庆华 食源性病原微生物检测技术[M] 武汉: 湖北科学技术出版社, 2003

[4] 杨婷婷, 李世清, 郭维植, 等 抗肠出血性大肠杆菌O₁₅₇: H7 鸡卵黄抗体的初步研究[J] 海峡预防医学杂志, 2001, 7(4): 3-5

[5] 沈关心, 周汝麟 现代免疫学实验技术[M] 武汉: 湖北科技出版社, 1998: 112-122

[6] 宋宏新, 薛海燕, 杨大庆, 等 抗风疹病毒卵黄免疫球蛋白的间接酶联免疫法检测的研究[J] 中华检验医学杂志, 2004, 27(4): 249-250

[7] 宋宏新, 高 栋, 薛海燕 卵黄免疫球蛋白的分离提取与鉴定[J] 食品科技, 2003(5): 99-101

[8] 李洪彬, 刘力威, 黄宇翔, 等 抗传染性法氏囊病卵黄抗体的研制与应用[J] 黑龙江畜牧兽医, 2002(9): 31-32

[9] 林祥梅, 赵增连, 田国斌, 等 间接EL ISA、HI及AGP 检测鸡血清中抗A_{IV} 抗体的敏感性比较[J] 中国兽医学报, 1998, 18(5): 454-456

Indirect EL ISA detection of IgY specific on *E. coli* O₁₅₇

XUE Hai-yan, LI Hong-xin, SONG Hong-xin

(Life Science & Engineering College, Shanxi University of Science and Technology, Xianyang, Shaanxi 712081, China)

Abstract: Chicken was immunized with *E. coli* O₁₅₇ as antigen, which produced a large amount of immunoglobulin of high titer in egg yolk, also called IgY. Indirect EL ISA detection of IgY specific on *E. coli* O₁₅₇ was studied. The parameters were as follows: polystyrene chloride microtitration plates were coated with *E. coli* O₁₅₇ antigen at the amount of 10⁸- 10⁹/mL, 19 h at 4℃. The working concentration of HRP-labelled rabbit anti-chicken IgG was 1 : 320. Egg yolk pretreated with water-dilution improved the performance of EL ISA detection. The EL ISA system is dependable and good for the assay and surveillance of *E. coli* O₁₅₇ specific IgY.

Key words: *Escherichia coli* O₁₅₇; immunoglobulin of yolk (IgY); enzyme-linked immunosorbent assay