



## 抗HLA-A\*0201重链卵黄抗体的制备及初步鉴定

鸡卵黄抗体(yolk immunoglobulin, IgY)来自于鸡血清的IgG,具有不与人类风湿因子结合[1]、不激活补体系统[2]、不结合金黄色葡萄球菌蛋白A[3]等免疫学特性,因此在某些免疫学分析中,用IgY可避免假阳性反应。另外,IgY还具有产量高、稳定性好和制备成本低廉等优点。目前已在病毒[4]、细菌[5]等颗粒性抗原成功提取IgY。人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA) I类分子由高度多态的 $\alpha$ 重链(heavy chain, HC)和保守的 $\beta$ 轻链( $\beta$ -microglobulin,  $\beta_2m$ )非共价结合而成,分布于所有有核细胞表面,其主要功能是递呈内源性多肽,诱导特异性细胞毒性T淋巴细胞(CTL)反应。本研究将HLA I类分子最常见类型HLA-A\*0201的HC作为抗原,免疫产蛋鸡,制备了大量高效价、高纯度的IgY。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

HC工程菌由Oxford大学徐小宁教授馈赠。健康产蛋鸡(岭南黄鸡)由广东省农业科学院畜牧研究所提供,共10只。

#### 1.2 方法

1.2.1 HC抗原的制备 将HC工程菌发酵,收集菌体,冰浴下超声破菌,得到粗包涵体,按专利技术(专利号CN1169998A)制包涵体。将精制包涵体变性、复性及超滤后,用DEAE Sepharose Fast Flow阴离子交换及Superdex 75凝胶过滤纯化。

1.2.2 免疫程序 将抗原分别与完全福氏佐剂按1:1混匀乳化后,颈部皮下注射岭南黄鸡。每只产蛋鸡抗原接种剂量为150  $\mu$ g,2周后以同样剂量抗原加不完全福氏佐剂颈部皮下注射,2周后以同样剂量抗原颈部皮下注射。

1.2.3 血清抗体的收集和提取 首次免疫前、2次免疫前、3次免疫前和实验结束时,对所有实验鸡翅静脉采血1 ml。置4  $^{\circ}$ C过夜,10 000 r/min离心10 min,-20  $^{\circ}$ C储存血清。

1.2.4 卵黄抗体的收集和纯化 首次免疫前,收集蛋5~10只。首次免疫后所产的蛋全部收集,直至实验结束。取免疫后所产鸡蛋,弃蛋壳、蛋清及卵黄衣膜,取出蛋黄(约10 ml/枚),用双蒸水稀释10倍,充分混匀后置-70  $^{\circ}$ C过夜;弃上层脂质及下层沉淀,取中层液4  $^{\circ}$ C保存。加入饱和硫酸铵使终浓度达50%,经充分均匀搅拌后,于4  $^{\circ}$ C、15 000 r/min离心15 min,收集沉淀。用10 mmol/L Tris(pH 8.0)溶解,再加入饱和硫酸铵,使其浓度达33%,离心收集沉淀。

1.2.5 血清抗体和卵黄抗体效价的测定 采用ELISA方法。抗原包被用纯化的HC抗原。一抗为血清、提纯前后卵黄。二抗即抗鸡IgY,工作浓度为1:20 000。

1.2.6 IgY蛋白含量的测定 于波长260 nm、280 nm处测D( $\lambda$ )值,用公式 $1.45D(280)-0.74D(260)$ 计算IgY蛋白含量。

1.2.7 纯化产物鉴定 各步骤收集的IgY样品用12%SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝R250染色,显示结果。

## 2 结果

### 2.1 HC重组蛋白的纯化效果

凝胶扫描分析HC表达水平为菌体总蛋白的43%。超滤浓缩的HC用DEAE Sepharose Fast Flow阴离子交换层析纯化，HC不吸附，杂蛋白分别被1 mol/L NaCl洗脱，HC的纯度达到90%。经Superdex 75凝胶过滤后，纯度>95%。

### 2.2 HC重组蛋白免疫产蛋鸡后血清抗体和IgY动态变化规律

免疫前IgY和血清抗体的滴度小于1:10，血清抗体的效价比卵黄抗体上升速度快，14 d时达1:10<sup>4</sup>，卵黄抗体为1:10<sup>3</sup>；血清抗体在35 d时效价与IgY持平，达1:10<sup>6</sup>。

### 2.3 蛋白质含量测定

分光光度计测得D(260)为0.625，D(280)为0.993，由公式计算出IgY蛋白含量9.77 mg/ml卵黄。

### 2.4 IgY纯度的测定

SDS-PAGE电泳及扫描分析结果(图1)表明，经水稀释法纯化后，在67 000及30 000附近示2条电泳带，分别为IgY的重链和轻链，纯度达到90%以上。

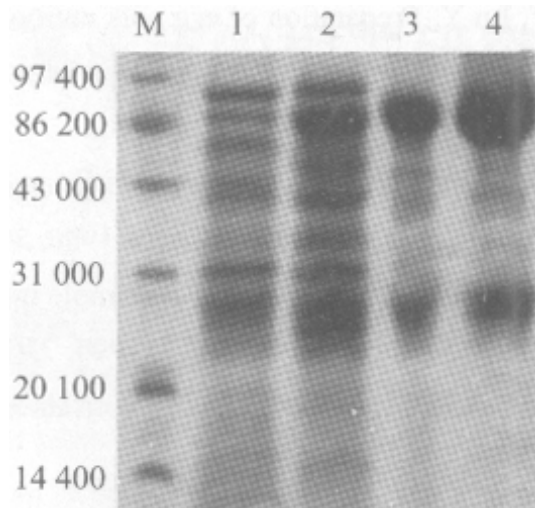


图1 HC重组蛋白IgY纯化的SDS-PAGE电泳图

Fig.1 SDS-PAGE analysis of HC IgY

M: Low-molecular-weight marker; Lane 1: Sample before immunization; Lane 2: Sample after immunization; Lane 3: Salt precipitation with 50% ammonium sulfate; Lane 4: Salt precipitation with 33% ammonium sulfate

## 3 讨论

鸡卵黄IgG又称IgY[6]，存在于免疫后母鸡的卵黄中，是卵黄中唯一的免疫球蛋白。首次免疫后，血清抗体比IgY大约早出现1周，表明抗体从血液到卵黄需要一个传递过程[7]；加强免疫后，两者趋于一致。卵黄制备的特异性抗体具有产量高、稳定性好和成本低廉的优点，故可以用IgY代替血清抗体，用以大量生产抗体供进一步研究及应用。IgY很难从丰富的卵黄磷脂中分离出来，限制了其作为抗体来源的研究。Jensenius[8]和Polson[9]在20世纪80年代相继建立了硫酸葡聚糖提取法和聚乙二醇提取法。有报道用Xanthan提取，获得的IgY产量为7.3 mg/ml卵黄，纯度约89%[2]。本研究用水稀释法提取IgY，产量为9.77 mg/ml，经SDS-PAGE分

析, 出现2条蛋白带, 纯度达到90%以上。CTL通过识别细胞表面与MHC-I类分子结合的抗原肽而杀伤靶细胞, 是机体抗肿瘤、抗移植物及有效控制各种感染的重要途径之一。近年来用基因重组技术产生的MHC-Ig复合体[10]可有效地检测和活化特异性CTL。其基本过程是MHC和其抗体的基因克隆于载体中进行表达纯化, 再与特异性多肽表位结合形成特异性MHC-Ig复合体, 进而诱导特异性CTL反应, 还可进行间接荧光法标记, 在流式细胞仪下检测特异性CTL的频数。我所人员已将HLA-A\*0201和特异性多肽表位结合成HLA-A\*0201-肽复合体(待发表)。本研究中HLA-A\*0201的HC抗原在福氏佐剂的辅助下可有效地导致种鸡免疫, 其卵黄用水稀释法制备的IgY产量多、效价及纯度高。

(责任编辑: 黄开颜)

#### 参考文献:

- [1] Larsson A. Chicken antibodies: a tool to avoid false position results by rheumatoid factor in latex fixation tests[J]. J Immunol Methods, 1988, 108(1-2): 205-8.
- [2] Larsson A, Wejaker PE, Forsberg PO, et al. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA[J]. J Immunol Methods, 1992, 156(1): 79-83.
- [3] Hoffman WL, Ruggles AO, Tabarya D. Chicken anti-protein A prevents Staphylococcus aureus protein A from binding to human and rabbit IgG in immunoassays and eliminates most false positive results[J]. J Immunol Methods, 1996, 198(1): 67-77.
- [4] 李久香, 何亚娟, 周济兰, 等. 乙肝蛋黄抗体的制备和鉴定[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(4): 109-10.
- Li JX, He YJ, Zhou JL, et al. Preparation and identification of egg yolk antibody against hepatitis B[J]. Chin J Zoonoses, 2000, 16(4): 109-10.
- [5] 周艺, 俞立英, 吕元. 抗变形链球菌卵黄抗体的初步研制[J]. 上海医学检验杂志, 2002, 17(2): 79-81.
- Zhou Y, Yu LY, Lu Y. Preparation of egg yolk antibody specific to Streptococcus mutans[J]. Shanghai J Med Lab Sci, 2002, 17(2): 79-81.
- [6] Hatta H, Kim M, Yamamoto T. A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY" [J]. Agric Biol Chem, 1990, 54(10): 2531-5.
- [7] Bhanushali JK, Gilbert JM, McDougald LR. Simple method to purify chicken immunoglobulin G[J]. Poult Sci, 1994, 73(7): 1158-61.
- [8] Jensenius JC, Andersen I, Hau J, et al. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG[J]. J Immunol Methods, 1981, 46(1): 63-8.
- [9] Polson A, Coetzer T, Kruger J, et al. Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens[J]. Immunol Invest, 1985, 14(4): 323-7.
- [10] Schneck JP. Monitoring antigen-specific T cells using MHC-Ig dimers[J]. Immunol Invest, 2000, 29(2): 163-9.

#### 参考文献:

- [1] Larsson A. Chicken antibodies: a tool to avoid false position results by rheumatoid factor in latex fixation tests[J]. J Immunol Methods, 1988, 108(1-2): 205-8.
- [2] Larsson A, Wejaker PE, Forsberg PO, et al. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA[J]. J Immunol Methods, 1992, 156(1): 79-83.
- [3] Hoffman WL, Ruggles AO, Tabarya D. Chicken anti-protein A prevents Staphylococcus aureus protein A from binding to human and rabbit IgG in immunoassays and eliminates most false positive results[J]. J Immunol Methods, 1996, 198(1): 67-77.
- [4] 李久香, 何亚娟, 周济兰, 等. 乙肝蛋黄抗体的制备和鉴定[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000,

16(4): 109-10.

Li JX, He YJ, Zhou JL, et al. Preparation and identification of egg yolk antibody against hepatitis B[J]. Chin J Zoonoses, 2000, 16(4): 109-10.

[5] 周艺, 俞立英, 吕元. 抗变形链球菌卵黄抗体的初步研制[J]. 上海医学检验杂志, 2002, 17(2): 79-81.

Zhou Y, Yu LY, Lu Y. Preparation of egg yolk antibody specific to Streptococcus mutans [J]. Shanghai J Med Lab Sci, 2002, 17(2): 79-81.

[6] Hatta H, Kim M, Yamamoto T. A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY" [J]. Agric Biol Chem, 1990, 54(10): 2531-5.

[7] Bhanushali JK, Gilbert JM, McDougald LR. Simple method to purify chicken immunoglobulin G[J]. Poult Sci, 1994, 73(7): 1158-61.

[8] Jensenius JC, Andersen I, Hau J, et al. Eggs: conveniently packaged antibodies. Methods for purification of yolk IgG[J]. J Immunol Methods, 1981, 46(1): 63-8.

[9] Polson A, Coetzer T, Kruger J, et al. Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens[J]. Immunol Invest, 1985, 14(4): 323-7.

[10] Schneck JP. Monitoring antigen-specific T cells using MHC-Ig dimers[J]. Immunol Invest, 2000, 29(2): 163-9.

---

[回结果列表](#)