

间接ELISA法对*H pylori*免疫牛初乳中抗体的检测

周冬仁, 王锋, 张常印, 崔山, 唐泰山, 偶健

周冬仁, 王锋, 崔山, 偶健, 南京农业大学动物科技学院 江苏省南京市 210095
张常印, 唐泰山, 江苏省出入境检验检疫局动检实验室 江苏省南京市 210001
江苏省国际合作项目, No. BZ2005041
通讯作者: 王锋, 210095, 江苏省南京市, 南京农业大学动物科技学院. f_wang2001@sina.com
收稿日期: 2006-01-10 接受日期: 2006-02-09

Indirect ELISA in detection of antibodies in colostrums of the cows immunized with *Helicobacter pylori*

Dong-Ren Zhou, Feng Wang, Chang-Yin Zhang, Shan Cui, Tai-Shan Tang, Jian Ou

Dong-Ren Zhou, Feng Wang, Shan Cui, Jian Ou, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China
Chang-Yin Zhang, Tai-Shan Tang, Laboratory of Animal Quarantine, Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, Jiangsu Province, China
Supported by the International Cooperation Project of Jiangsu Province, No. BZ2005041
Correspondence to: Feng Wang, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China. f_wang2001@sina.com
Received: 2006-01-10 Accepted: 2006-02-09

Abstract

AIM: To observe the changes of specific antibodies in the cow colostrums by indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

METHODS: Two pregnant cows (non-parous and parous) were immunized with *H pylori* whole-cell antigen (4×10^9 CFU) via intramuscular injection in the neck. The colostrums were collected with 7 days after parturition.

RESULTS: *H pylori* induced significant immune responses in both cows, and the efficacy of anti-*H pylori* in the parous cow reached the peak values (5.84) at the first day after parturition, which was significantly higher than that in the non-parous cows (3.51, $P < 0.05$). However, the efficacies dropped quickly with 7 days. Weak positive anti-*H pylori* were observed only at the

first day in the control cow.

CONCLUSION: The immune response is superior in the parous cow to that in the non-parous one.

Key Words: Indirect ELISA; *Helicobacter pylori*; Colostrums

Zhou DR, Wang F, Zhang CY, Cui S, Tang TS, Ou J. Indirect ELISA in detection of antibodies in colostrums of the cows immunized with *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(11):1103-1106

摘要

目的: 建立间接ELISA法测定牛初乳中*H pylori*抗体的水平, 并观察特异性抗体的产生规律。

方法: 本试验以*H pylori*全菌抗原免疫妊娠母牛, 每头牛每次肌肉注射 4×10^9 CFU全菌抗原, 收集分娩后7 d内的初乳。以间接ELISA法检测其中*H pylori*抗体水平。

结果: *H pylori*能有效地引起免疫应答, 成年牛初乳中的抗体效价在分娩当天达到最大值5.84, 高于青年牛的3.51($P < 0.05$), 随后迅速下降。对照奶牛仅在分娩当天检测到微弱阳性。

结论: 成年牛的对*H pylori*的免疫应答好于青年牛。

关键词: 间接ELISA; 幽门螺杆菌; 初乳

周冬仁, 王锋, 张常印, 崔山, 唐泰山, 偶健. 间接ELISA法对*H pylori*免疫牛初乳中抗体的检测. 世界华人消化杂志 2006;14(11):1103-1106
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1103.asp>

0 引言

自1982年Warren和Marshall首先从人类胃黏膜中培养出幽门螺杆菌(*H pylori*)以来, 大量研究证实*H pylori*感染是慢性活动性胃炎、消化性溃疡的主要病因, 已严重威胁着人类的健康^[1-4]。抗生素

■背景资料

在我国, 关于免疫乳概念的引进及免疫乳的研究始于1990年代, 现在这一概念已被乳品行业所接受。免疫乳抗体的被动传递用于治疗胃肠道疾病, 是这些疾病免疫治疗方面的一个新的思路。本文利用间接ELISA方法对免疫后的血清及初乳进行检测, 旨在研究其特异性抗体的产生规律, 为制备高含量的抗*H pylori*免疫乳制品及相关生物制品提供技术依据。

■同行评价

本文利用间接ELISA方法对免疫后的血清及初乳进行检测,旨在探索其特异性抗体的产生规律,为制备高含量的抗*H pylori*免疫乳制品及相关生物制品提供技术依据,为临床应用被动免疫方法*H pylori*相关胃肠疾病提供了一个新的思路,具有科学性及可读性。

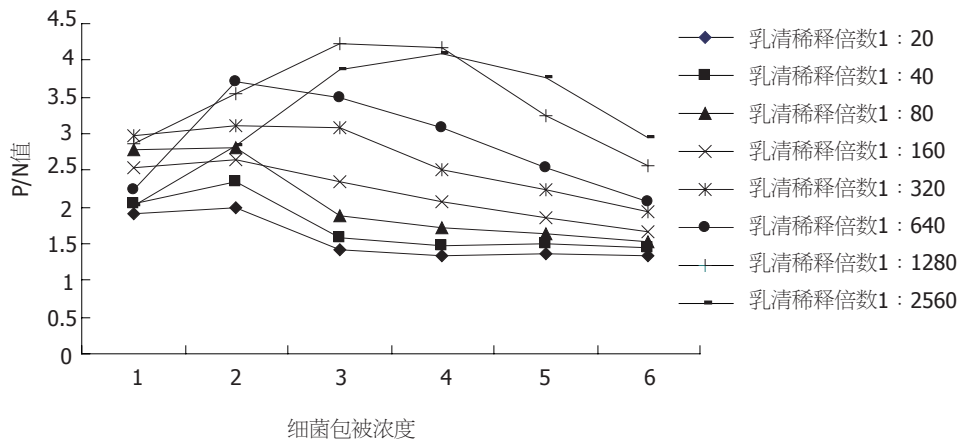


图1 细菌最适包被浓度和乳清稀释度的选择。

联合疗法是目前常用的方法,但耐药菌株的不断出现和治愈后的复发给治疗增加了难度^[5]。在疫苗的研制方面,虽取得了很大进展,但在免疫原、佐剂、免疫途径等细节问题上还没有完善,目前还无法用于实际应用^[6-7]。因此,许多学者将注意力转移到通过人工被动免疫来防治胃肠道疾病,可望利用多克隆抗体的被动传递或单克隆抗体的局部应用来预防和治疗*H pylori*引起的慢性胃炎与胃、十二指肠溃疡。免疫乳抗体的被动传递用于治疗胃肠疾病,是这些疾病免疫治疗方面的一个新的思路。我们利用间接ELISA方法对免疫后的血清及初乳进行检测,旨在研究其特异性抗体的产生规律,为制备高含量的抗*H pylori*免疫乳制品及相关生物制品提供技术依据^[8-10]。

1 材料和方法

1.1 材料 国际标准菌株NCTC11637,购于上海消化道疾病研究所。培养基为含有马血清60 mL/L,盐酸万古霉素10 g/L,两性霉素B 10 g/L,多黏菌素B 0.5 g/L,甲氧苄胺嘧啶0.5 g/L的哥伦比亚固体培养基。37℃,微需氧条件下培养72 h^[11]。妊娠后期的3头奶牛,选自江苏省泰州市卫岗奶牛场。

1.2 方法 第1次免疫为分娩前42 d,取2 mL灭活菌液用等体积弗氏完全佐剂(购于Sigma公司)充分乳化后于颈部皮下多点注射,每次菌量为 4×10^9 CFU/头。以后改用弗氏不完全佐剂乳化,分别在分娩前28, 17, 7 d进行3次免疫,菌量如上。其中一头为对照组。第1次采集血样为分娩前42 d,以后每隔1 wk采集1次血样,分离血清分装后置于-20℃保存备用。第1次采集乳样为分娩后8 h,以后每隔8 h采集1次,连续采7 d,以上样本采集后置于-20℃保存备用。将采集的乳样于室温解冻后,取20 mL于试管中加入凝乳酶,37℃静置2 h后,2500 r/min离心15 min,取上层清亮乳清

置于-20℃保存备用。取聚苯乙烯96孔ELISA板,每孔加入12.5 g/L的戊二醛溶液200 μL,37℃温育2 h。取出后,在洗板机上用蒸馏水洗涤3次,每次300 μL。将灭活的菌液用包被液(0.05 mol/L pH 9.6的碳酸盐缓冲液)稀释至 5×10^{11} CFU/L,每孔加入50 μL,37℃温育20-24 h。每孔加入220 μL封闭液(1 g/L BSA),4℃过夜。之后,用洗涤液(0.5 g/L Tween-20)洗涤三次,每次300 μL,干燥。至此,ELISA板可放在-20℃保存备用。将待检样本用封闭液稀释至所需浓度,每孔加入50 μL,37℃温育1 h,用洗涤液洗板3次,每次300 μL。用酶标抗体稀释液(10 g/L BSA)将酶标兔抗牛IgG抗体(购于Sigma公司)1:2×10⁴稀释,每孔加入50 μL,37℃温育1 h,用洗涤液洗板3次,每次300 μL。每孔加入100 μL底物显色液(OPD-H₂O₂溶液),室温避光反应20 min。每孔加入50 μL终止液终止反应。在酶标仪上用490 nm和620 nm双波长测定每孔的吸光度(A)值。

2 结果

2.1 细菌最适包被浓度和乳清稀释度 用方阵滴定法:细菌浓度作 $0.3125-40 \times 10^{11}$ CFU/L倍比稀释,乳清作1:20-2560倍比稀释。可见在酶标兔抗牛IgG抗体工作浓度为1:20 000条件下,细菌浓度为 5×10^{11} CFU/L时P/N值最高(图1),故选用 5×10^{11} CFU/L的细菌浓度为包被浓度,1:1280为乳清稀释度。

2.2 酶标兔抗牛IgG抗体最适反应时间及底物最适反应时间 其他条件固定的情况下,酶标兔抗牛IgG抗体的反应时间分别为30, 60, 90和120 min。随着反应时间的延长,阳性和阴性的A值相应增加,当温育时间为60 min时P/N值最大。故确定酶标兔抗牛IgG抗体的最佳反应时间为60 min。其他条件固定的情况下,底物的反应

表 1 乳清的抗体效价

分娩后 (d)	时间	P/N值		
		01047	01104	9608
1	8:00		3.65	
	16:00	5.84	3.51	2.73
	24:00	5.09	2.89	
2	8:00		2.35	
	16:00	3.40	2.49	1.49
	24:00	3.86	2.23	
3	8:00	3.83	1.78	
	16:00	2.81	1.57	1.1
	24:00	3.33	1.11	
4	8:00	2.61	1.68	
	16:00	2.65	1.53	0.79
	24:00	2.16	1.81	
5	8:00	1.54	1.55	
	16:00	2.49	1.7	0.89
	24:00	2.11	1.63	
6	8:00	2.14	1.57	
	16:00	2.06	1.49	0.80
	24:00	1.57	1.48	
7	8:00	1.32	1.64	
	16:00	1.22	1.69	0.78
	24:00	1.4	1.65	

时间分别为10, 20, 30, 40 min. 随着反应时间的延长, 阴性和阳性的A值相应增加, 当温育时间为20 min时P/N值最大. 故底物最适反应时间为20 min.

2.3 免疫奶牛乳清抗体效价 按照上面得出的最佳反应条件, 检测所采集到的乳清样. 可见两头免疫奶牛抗体效价的最高值均出现在分娩后1 d, 01047初乳中IgG的含量高于01104. 随着泌乳的进行, 抗体效价迅速降低. 泌乳4 d以后, 两头奶牛的乳中抗体效价P/N值均<2.1(阴性), 而对照组奶牛仅在分娩当天检测到微弱阳性, 且P/N值均小于试验组(表1). 测得血清抗体效价见表2.

3 讨论

影响ELISA测定的因素很多, 固相载体的吸附性能直接影响ELISA的测定. 不同材料的固相载体吸附性不同, 最常用的是聚苯乙烯. 为了有效地将含游离氨基的抗体或抗原包被到聚苯乙烯载体上, 可用戊二醛对载体进行处理. 聚苯乙烯在pH相对低的情况下被激活, 而戊二醛在这种情况下不能形成聚合物, 加入pH 9.6的抗原包被液后, 便可提高戊二醛的反应性^[12]. 封闭是继包被之后用高浓度的无关蛋白质溶液再包被的过程, 让大量不相关的蛋白质填充固相载体表面尚有的未被占据的空隙, 从而排除非特异性的吸附. 为了避免酶标结合物在反应中直接吸附在固相

表 2 血清抗体效价

	分娩前天数							分娩	分娩后天数	
	50	43	36	29	22	13	8		0	3
01047	1.04	1.10	1.90	2.80	3.41	4.27	4.26	4.56	4.54	4.34
01104	39	32	25	18	11	0	3			
P/N值	1.01	1.21	1.46	2.51	3.16	2.82	2.80			

载体上, 在稀释缓冲液中常加入高浓度的无关蛋白质, 本试验加入10 g/L BSA作为封闭液, 通过竞争以抑制结合物的吸附. 此外, 还加入了具有抑制蛋白质吸附于塑料表面的非离子型表面活性剂Tween-20, 浓度为0.5 g/L.

牛乳中高浓度的Ig主要来自血液的转移, 特别是IgG1. 在产犊前几周, IgG开始进入乳腺, 在产犊时或接近产犊时停止进入. Newby *et al*经计算, 初乳中IgG1几乎100%来自血液. Brandon *et al*^[13]及Sasaki *et al*^[14]的研究也得出相似的结论. 初乳中IgG浓度最高, 但随着泌乳进行迅速下降. Ishikawa *et al*对Holstein牛研究表明, 在产后2 h内, 初乳中总蛋白为16.8%, 到10-12 h, 降到13.5%. Levieux *et al*^[15]对60头乳样进行检测, 在头2 d内, 每次挤乳, IgG浓度下降50%左右^[14]. 本试验表明, 免疫奶牛在分娩当天初乳中抗体效价最高, 随着泌乳的进行, 抗体效价逐渐降低, 分娩4 d以后, 初乳中抗*H. pylori*抗体的P/N值呈阴性. 初乳中IgG浓度除受品种、营养等因素影响外, 还受奶牛的胎次影响, 第1胎的初乳量要远远低于第2胎以后的牛. 我们也得到类似的结果. 成年牛01047初乳中的抗体效价高于青年牛01104.

我们初步建立了检测抗*H. pylori*牛奶中抗体的方法, 观察了*H. pylori*全菌抗原通过肌肉注射引起妊娠奶牛免疫应答、产生特异性IgG抗体的变化规律. 在由初乳向常乳的过渡中, 各种Ig的相对浓度变化很小, 但这是否就说明了不同泌乳阶段, 乳这一分泌物的生理功能只是轻微地发生了变化. 在常乳期免疫奶牛后在乳中是否有特异性抗体存在, 需要做进一步工作来证实. 而且在肠道酶环境下, 初乳中抗特异性IgG抗体是否具有免疫反应活性需要通过动物模型来深入研究. 通过食用免疫乳制品来调整肠道微生态环境, 清除肠道中病原菌和腐败菌及其产生的毒素, 从而调整整个机体的健康, 将是一种经济、理想的方法. 怎样将被动免疫采用更合理、更易接受的方法和途径运用于大规模人群防治胃肠疾病的实践是一个崭新的课题.

4 参考文献

- 1 Treiber G, Malfertheiner P. *Helicobacter pylori*-2002. *Schweiz Rundsch Med Prax* 2002; 91: 773-778
- 2 Hellmig S, Mascheretti S, Renz J, Frenzel H, Jelschen F, Rehbein JK, Folsch U, Hampe J, Schreiber S. Haplotype analysis of the CD11 gene cluster in patients with chronic *Helicobacter pylori* infection and gastric ulcer disease. *Tissue Antigens* 2005; 65: 271-274
- 3 Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. Induction of apoptosis as a proposed pathophysiological link between glaucoma and *Helicobacter pylori* infection. *Med Hypotheses* 2004; 62: 378-381
- 4 Sykora J, Valeckova K, Hejda V, Varvarovska J, Stozicky F. Accurate noninvasive diagnosis of *Helicobacter pylori* infection using antigen determination in the feces in the pediatric population. *Cas Lek Cesk* 2002; 141: 425-427
- 5 周殿元, 陈焯. 幽门螺杆菌感染的药物治疗新进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 157-159
- 6 Aebischer T, Schmitt A, Walduck AK, Meyer TF. *Helicobacter pylori* vaccine development: facing the challenge. *Int J Med Microbiol* 2005; 295: 343-353
- 7 Gunter Bode, Isolde Piechotowski, Dietrich Rothenbacher, Hermann Brenner. *Helicobacter pylori*-Specific immune responses of children: implications for future vaccination strategy. *Clinica and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002; 1126-1128
- 8 Naoko Yunoki, Kenji Yokota, Motowo Mizuno, Yoshiro Kawahara, Masayasu Adachi, Hiroyuki Okada, Shyunji Hayashi, Yoshikazu Hirai, Keiji Oguma, Takao Tsuji. antibody to heat shock protein can be used for early serological monitoring of *Helicobacter pylori* eradication treatment. *Clinica and Diagnostic Laboratory Immunology* 2000; 574-577
- 9 张世联, 刘冉, 王薇. 牛幽门螺杆菌抗体中和菌体蛋白对Hela细胞的生长抑制作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1828-1833
- 10 Ewaschuk JB, Naylor JM, Chirino-Trejo M, Zello GA. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG is a potential probiotic for calves. *Can J Vet Res* 2004; 68: 249-253
- 11 刘文忠, 施尧, 戈之铮. 幽门螺杆菌研究进展. 上海: 科学技术文献出版社, 2001: 91-93
- 12 杨利国, 胡少昶, 魏平华, 郭爱珍. 酶免疫测定技术. 南京: 南京大学出版社, 1998: 137-139
- 13 Brandon MR, Watson DL, Lascelles AK. The mechanism of transfer of immunoglobulin into mammary secretion of cows. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1971; 49: 613-623
- 14 Sasaki M, Davis CL, Larson BL. Production and turnover of IgG1 and IgG2 immunoglobulins in the bovine around parturition. *J Dairy Sci* 1976; 59: 2046-2055
- 15 Leveux D, Ollier A. Bovine immunoglobulin G, beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin and serum albumin in colostrum and milk during the early post partum period. *J Dairy Res* 1999; 66: 421-430

电编 李琪 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第二届全国小肠疾病学术会议

本刊讯 第二届全国小肠疾病学术会议将于2006-08-23/27在太原举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文, 结构式摘要(1000字), 电脑打印(附软盘)或E-mail, 2006-04-31截稿.

2 联系方式

山西省太原市双塔东街29号山西少人民医院内镜中心 陈星; 邮编: 030012; 电话: 0351-4960028; E-mail: senj29@163.com.