

牛乳中抗幽门螺杆菌特异性抗体的间接ELISA法的建立

刘冉¹, 张世联², 牟振云³, 王薇²

(1. 东南大学公共卫生学院, 江苏南京 210009; 2. 河北省疾病预防控制中心, 河北石家庄 050021; 3. 河北医科大学, 河北石家庄 050020)

[摘要] **目的** 建立抗幽门螺杆菌(Hp)特异性抗体的ELISA检测方法,用于牛乳中抗Hp特异性抗体的检测。**方法** 超声Hp全菌抗原接种奶牛,按多克隆抗体制备技术制备牛抗Hp抗血清。用纯化牛IgG免疫家兔,制备兔抗牛IgG多克隆抗体。硫酸铵盐析,DEAE-32柱层析分别纯化牛与兔IgG。兔抗牛IgG以辣根过氧化物酶标记。用Hp全菌抗原包被反应板,建立间接ELISA法用于牛乳抗Hp抗体的检测。**结果** 建立的抗Hp间接ELISA法的最佳包被抗原量为1.47 μ g/孔,HRP-兔抗牛IgG 1:600稀释,标准曲线方程为 $A=0.0124+0.3988 \ln C$,相关系数 $r=0.9998$,线性范围为1.8~145 μ g/ml,回收率在86.4%~92.8%,变异系数为9.4%~12.3%。**结论** 初步建立牛乳中抗Hp抗体的间接ELISA测定法,可用于Hp免疫牛乳中抗Hp特异性IgG的检测。

[关键词] 幽门螺杆菌;免疫乳;间接ELISA

中图分类号: R392.11;R573 文献标识码: A 文章编号: 1672-271X(2008)03-0174-04

Development of indirect enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for detection of anti-Helicobacter pylori antibodies from bovine immune milk

LIU Ran¹, ZHANG Shi-lian², MOU Zhen-yun³, WANG Wei² (1. School of Public Health, Southeast University, Nanjing, 210009, Jiangsu, China; 2. Hebei Center for Disease Control and Prevention, Shijiazhuang 050021, Hebei, China; 3. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050020, Hebei, China)

[Abstract] **Objective** To develop an ELISA method for specific detection of anti-Helicobacter pylori antibodies from bovine immune milk. **Methods** Cows were immunized routinely with Hp sonicate antigens, and rabbits were immunized with purified bovine IgG. Bovine anti-Hp and rabbit anti-bovine polyclonal antibodies were purified with ammonium sulfate and DEAE-32. Indirect-ELISA was developed for detection of anti-Helicobacter pylori IgGs in milk with HRP-rabbit anti-bovine IgGs. **Results** The optimal working dose of coating antigens was 1.47 μ g/well and the dilution of HRP-rabbit anti-bovine IgGs was 1:600. The standard equation of the indirect-ELISA was $OD=0.0124+0.3988 \ln C$ and the correlation coefficient was 0.9998. Linear range of anti-Hp IgG detection was 1.8~145 μ g/ml. The anti-Hp IgG recovery rate varied from 86.4% to 92.8% with the range of coefficient of variation as 9.4%~12.3%. **Conclusion** The indirect-ELISA developed in this study can be used to detect anti-Hp specific IgG in bovine immune milk.

[Key words] Helicobacter pylori; Immune milk; Indirect-ELISA

牛乳及乳制品在世界范围广泛应用,有学者将某些免疫原接种奶牛,获得高效价抗体的牛乳用于被动免疫,随着研究的深入,国内外已有相应的乳产

品问世,其免疫防治的范围也日益扩大^[1]。基于口服抗体的应用前景^[2-4],目前国内外已有多家单位开始研制抗Hp免疫乳的免疫防治作用。由于口服免疫具有非侵入性、符合人们的饮食习惯,可有效的多次、长期免疫,有免疫依从性好、免疫效果可靠等特点,相关研究亦发现口服免疫在消化道疾病的防治

基金项目:河北省医学科研基金项目(01118)

作者简介:刘冉(1974-),女,山东平原人,博士,讲师,从事肿瘤环境基因组学研究。

中有着明显效果,因此在防治消化道疾病中也有着广阔的应用前景。

自1983年从病人胃活检标本分离培养出幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp),人们对幽门螺杆菌的研究和认识日益深入。由于幽门螺杆菌的高感染率及临床耐药菌株日益增多易复发,人们把对Hp的控制亦寄希望于口服免疫^[5-8]。在口服免疫防治幽门螺杆菌感染方面,抗幽门螺杆菌特异性抗体的效价是评价免疫牛乳及相关乳制品免疫学价值的一个重要方面。本次研究建立了定量检测抗幽门螺杆菌特异性抗体的间接ELISA法用于测定免疫牛乳中抗幽门螺杆菌特异性抗体的水平。

1 材料与方 法

1.1 材料与动物 泌乳期的荷斯坦奶牛,体重650 kg,由河北省利盟高新技术有限公司提供;新西兰兔,二级动物,雄性,体重1.7 kg,由河北医科大学动物中心提供;DEAE-32、辣根过氧化物酶(HRP)购自Sigma公司;酶联免疫检测仪(华东电子管厂),SL-2 数控层析冷柜(北京四环科学仪器厂)。

1.2 牛抗 Hp 抗体的制备 以 Hp 标准株 NCTC11637 经传代扩增得到菌体,生理盐水洗涤后稀释至浓度为 10^9 CFU/ml,反复冻融,超声粉碎10次,每次间隔1 min,与等体积完全福氏佐剂充分乳化后腋下注射,第一次免疫后2周和4周分别改用不完全福氏佐剂进行2次加强免疫,以后每4~8周加强一次。

1.3 牛抗 Hp 抗体的分离纯化及鉴定 取免疫后牛血清经50%、33%、33%饱和硫酸铵粗提后,上DEAE-32柱(16 cm×1.8 cm)以pH6.5 PB(0.05 mol/L)和pH7.0 NaCl(0.05 mol/L)梯度洗脱,洗脱速度1 ml/min,收集2 ml/管,紫外监测蛋白质峰,收集高峰,测蛋白质浓度(紫外法)为1.45 mg/ml,分装后低温保存。另取纯化前牛抗血清、饱和硫酸铵粗提物、纯化牛IgG及标准牛IgG作SDS-PAGE,鉴定所纯化牛IgG的纯度。

1.4 兔抗牛多克隆抗体的制备与纯化 新西兰兔驯养1周后,以纯化牛IgG 1.45 mg,加福氏完全佐剂1 ml制成油包水制剂,经腹股沟及足跖皮下多点免疫。第一次免疫后2周和4周分别改用牛IgG 0.73 mg加福氏不完全佐剂1 ml进行2次加强免疫。间隔1周采血测效价 $>10^6$ (ELISA),颈动脉放血收集血清(总蛋白76.7 mg/ml),灭活后同1.3方法纯化兔IgG,测其蛋白质浓度1.37 mg/ml,得率3.6%,SDS-PAGE 鉴

定纯度 $>90\%$,分装后 -20C 保存备用。

1.5 兔抗牛 IgG 的辣根过氧化物酶(HRP)标记 取HRP 5 mg溶于pH5.6 0.2 mol/L 醋酸盐缓冲液0.5 ml中,加入新鲜配制的0.1 mol/L NaIO_4 0.25 ml,混匀。置 4C 30 min,加入2.5%乙二醇0.5 ml,混匀,置室温30 min。加入待标记抗体5~10 mg,用1.0 mol/L pH9.5 CBS调pH至9.0,混匀。 4C 过夜后加 NaHB_4 0.1 ml(0.5 mg)混匀。 4C 2 h后,用生理盐水透析24 h,其中更换三次透析液,每次300 ml,透析完毕加1/3~1/2量的中性甘油后分装 -20C 保存。

1.6 间接ELISA ①以Hp超声全菌蛋白质包板:Hp(NCTC11637)新鲜培养物收于生理盐水中,水浴超声6次,每次间隔1 min。蛋白质浓度1.47 mg/ml,作1:100稀释,包被浓度14.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$,每孔加抗原100 μl (1.47 μg), 4C 过夜;②弃去抗原包被液,PBS-T洗板,拍干,10 g/L BSA封闭, 4C 过夜;③PBS-T洗板,拍干,密封 4C 保存备用;④标准曲线:纯化牛抗Hp抗体以1:10,1:100,1:200,1:400……作倍比稀释,每孔加100 μl ,复孔, 4C 过夜;⑤次日弃一抗,PBS-T洗板,拍干;⑥加HRP-兔抗牛IgG 1:600稀释液100 $\mu\text{l}/\text{孔}$, 37C 水浴30 min后弃去,PBS-T洗板,拍干;⑦加显色剂A 50 μl 、显色剂B 50 μl ,显色10~15 min;⑧终止液终止显色,振荡混匀于酶标仪 $\lambda 450\text{ nm}$ 比色。

1.7 最佳包被抗原量的选择 试验中对包被抗原进行1:2,1:5,1:10,1:20,1:50,1:100,1:200,1:500,1:1000系列稀释,采用常规包被条件包板,进行牛抗Hp抗体的间接ELISA分析,根据包被抗原与包被板结合的饱和程度确定最佳包被量,用于标准曲线的建立。

2 结 果

2.1 牛抗Hp抗体的SDS-PAGE 纯化前牛抗血清总蛋白81.4 mg/ml,分离提纯后得率为3.14%。经SDS-PAGE电泳可得分子量(MW)55 kD左右的重链条带和25 kD左右的轻链条带,与标准牛IgG相比,蛋白质条带及纯度相似(见图1)。

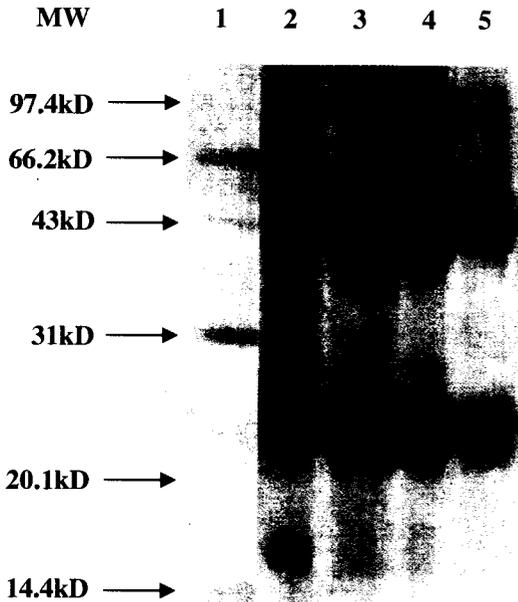
2.2 间接ELISA 在最佳包被抗原量为1.47 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 的包被条件下,采用10 g/L BSA封闭液,HRP-兔抗牛IgG 1:600稀释,对系列稀释的纯化牛抗Hp特异性IgG建立间接ELISA的标准曲线,其方程为 $A = 0.0124 + 0.3988 \ln C$,相关系数 $r = 0.9998$;该方法检测的线性范围为1.8~145 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2.3 回收率测定 在未免疫奶牛的对照牛乳中分别添加纯化的抗 Hp 特异性 IgG 100、50、25、12.5

μg/ml,结果见表1,回收率在86.4%~92.8%之间,变异系数为9.4%~12.3%。

表1 抗幽门螺杆菌特异性IgG在牛乳中的添加回收率

	添加抗幽门螺杆菌特异性IgG			
	100	50	25	12.5
测定值($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/ml}$)	92.8 ± 10.4	45.3 ± 4.3	22.4 ± 2.4	10.8 ± 1.3
回收率($\bar{x} \pm s, \%$)	92.8 ± 10.4	90.6 ± 8.6	89.6 ± 9.6	86.4 ± 10.6
变异系数(%)	11.2	9.4	10.7	12.3



泳道1:蛋白质分子量标准(kD);泳道2:牛抗Hp血清;泳道3:牛抗Hp血清饱和硫酸铵粗提物;泳道4:DEAE-32纯化牛抗Hp-IgG;泳道5:牛IgG标准品

图1 纯化牛抗Hp-IgG的SDS-PAGE图谱

3 讨论

Hp定植于人类上消化道,与慢性活动性胃炎(B型)、消化性溃疡和粘膜相关淋巴样组织淋巴瘤密切相关,并与胃癌发生率有流行病学的相关性^[9]。面对Hp的高感染率和临床耐药增加,国内外已开展了多项抗Hp特异性免疫球蛋白的被动免疫研究,早在1993年Thomas等^[10]发现接受Hp阳性的母亲哺乳的婴儿,其Hp感染的发生时间延迟,表明母乳中抗Hp特异性抗体能保护婴儿免受早期感染。Blahchard等^[11]应用抗尿素酶IgA71和IgG40在体外与Hf共育后接种小鼠,可预防Hf定植/感染。

国内亦进行了卵黄IgY对SS1感染小鼠的被动免疫治疗作用的研究,发现IgY可以清除SS1在小鼠体内的定植,减轻胃局部炎症^[12]。这些研究均表明被动免疫在Hp感染的预防和治疗中具有重要的意义。

由于牛乳服用安全,又有较完善的质量监控和评价系统,因此开发抗Hp的免疫乳及乳制品可能有助于控制Hp的高感染特征。本次研究建立了间接ELISA方法检测牛抗Hp特异性IgG,与双向琼脂糖扩散法相比,间接ELISA方法的检测灵敏度大大提高,其最低可检测的抗Hp-IgG的浓度为1.8 μg/ml,且其对各浓度添加抗体的回收率均在85%以上。这一方法可用于Hp免疫牛乳及相关乳制品中抗Hp特异性抗体的监测,为评价抗Hp免疫乳的免疫学价值提供灵敏、可靠的检测手段。

参考文献

- [1] 孙家财,褚庆环,孙高英,等.免疫乳的研究进展[J].食品与药品,2006,8(6):24-26.
- [2] 张和平,关红,郭军,等.免疫乳抗炎作用研究[J].营养学报,2006,28(5):386-390.
- [3] 裴晓言,顾名夏,黄鹤,等.牛乳中的免疫球蛋白与健康的研究[J].现代生物医学进展,2007,7(3):418-421.
- [4] 张和平,郭军.免疫乳-科学与技术[M].北京:中国轻工业出版社,2002:201-210.
- [5] 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[J].世界华人消化杂志,2005,13(15):1828-1833.
- [6] 陈昊湖.幽门螺杆菌感染的治疗策略[J].广东医学,2001,22(2):109-110.
- [7] Ferrero RL, Thiberge JM, Labigne A. Local immunoglobulin G antibodies in the stomach may contribute to immunity against helicobacter infection in mice[J]. Gastroenterology, 1997,113(1):185-194.
- [8] Korhonen H, Syväoja EL, Ahola-Luttilla H, et al. Bactericidal effect of bovine normal and immune serum, colostrum and milk against helicobacter pylori[J]. J Appl Bacteriol,1995,78(6):655-662.
- [9] Arif M, Syed S. Association of Helicobacter pylori with carci-

- noma of stomach[J]. J Pak Med Assoc, 2007, 57(7):337-341.
- [10] Thomas JE, Austin S, Dale A, et al. Protection by human milk IgA against *Helicobacter pylori* infection in infancy[J]. Lancet, 1993, 342(42):121.
- [11] Blanchard TG, Czinn SJ, Maurer R, et al. Urease-specific monoclonal antibodies prevent *Helicobacter felis* infection in mice[J]. Infect Immun, 1995, 63(4):1394-1399.
- [12] 陈翠萍, 杨朝晖, 王永廉. IgY 抗体在体外和体内对幽门螺杆菌作用的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2002, 22(1): 37-40.

(收稿日期:2008-03-07)

(本文编辑:潘雪飞; 英文编辑:王建东)

· 个 案 ·

多发性骨髓瘤误诊 1 例

张玲玲, 王 勇, 邵先安

(解放军第123医院, 安徽蚌埠 233015)

[关键词] 多发性骨髓瘤; 误诊

中图分类号: R733.3 文献标识码: B 文章编号: 1672-271X(2008)03-0177-01

1 病案摘要

患者,女,55岁,半年前出现头晕伴有全身疼痛不适,疼痛以右侧髋关节明显,无肢体功能障碍,无发热,多次在当地医院就诊,诊断为“类风湿性关节炎”,给予对症治疗,效果欠佳。于2007年3月19日来院就诊,查体:体温 36.3℃,脉搏 110次/分,血压 160/100 mm Hg,头颅五官无异常,双肺呼吸音正常,心率 110次/分,律齐,各瓣膜无病理杂音,腹部无异常,双下肢不肿,四肢关节活动自如,无肿痛现象。辅助检查示:白细胞 $6.5 \times 10^9/L$ 、红细胞 $2.6 \times 10^{12}/L$ 、血红蛋白 81 g/L、血小板 $175 \times 10^9/L$ 、血沉 138 mm/h;总蛋白 162 g/L、白蛋白 28 g/L、球蛋白 134 g/L、白球比 0.21;免疫球蛋白 IgG 8.36 g/L,免疫球蛋白 IgA 0.51 g/L,免疫球蛋白 IgM 0.76 g/L;尿本周蛋白阴性;类风湿因子阴性;抗链球菌溶血素“O”阴性;柯萨奇病毒阴性。初诊为贫血原因待查、多发性骨髓瘤待排。入院2日即行骨髓穿刺检查,提示原始浆细胞占有核细胞的5%,幼稚浆细胞占有核细胞的25%,确诊为多发性骨髓瘤(MM)。骨髓象显示:主要为浆细胞系异常增生,并有质的改变,进一步的实验室检查见外周血涂片中出现大量幼稚细胞,而该类细胞形态规则呈圆形、椭圆形,核不规则,呈圆形、不规则畸形,染色质呈粗颗粒状,少数可见核仁,浆量丰富,具有泡沫感;且成熟红细胞呈缗钱状排列。患者拒绝进一步治疗,自行出院。

2 讨论

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是指浆细胞异常增生的恶性肿瘤^[1]。骨髓内有异常浆细胞(或称骨髓瘤细胞)的增殖,引起骨骼的破坏,易导致贫血和肾功能损害等;

血清出现单克隆免疫球蛋白,尿内出现本周蛋白。本例患者只表现出MM的早期症状,即骨痛,没有出现骨骼浸润、破坏及肾功能损害等临床体征,心肺及骨盆平片未见明显异常,尿本周蛋白也是阴性,这种情况在MM中很少见,容易造成误诊。该患者因头晕,全身疼痛不适,以右侧髋关节为重而就医,当地医院未行相关的辅助检查仅凭关节疼痛诊断为“类风湿性关节炎”。患者入院后血液生化检查提示球蛋白高达 134 g/L,白球比明显倒置,考虑血液系统疾病而行骨髓穿刺,检查结果显示:原始+幼稚浆细胞异常增生,占有核细胞的30%,且有质的改变,外周血涂片中出现大量幼稚细胞,且成熟红细胞呈缗钱状排列而得已确诊。综合误诊的原因,我们认为:多发性骨髓瘤的临床表现复杂,早期临床表现不明显,首诊医生不应该只根据患者简单的主诉和单一的临床症状而主观诊断为某一疾病^[2-3]。作为临床医生,不能放过任何一个蛛丝马迹,应结合临床实验室的检查,从而提高早期诊断率,减少误诊,这对疾病的治疗和延长患者生存期具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] 谭齐贤,张树平. 临床血液学和血液学诊断[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2003:192.
- [2] 张 艳,江 滨,黄晓军,等. 多发性骨髓瘤的细胞遗传学研究[J]. 中国实验血液学杂志,2007,15(1):76-78.
- [3] 张文娟,孙彩霞. 多发性骨髓瘤误诊30例分析[J]. 中国误诊学杂志,2007,7(3):522-523.

(收稿日期:2008-01-29;修回日期:2008-03-10)

(本文编辑:潘雪飞)