



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101570574 B

(45) 授权公告日 2012.06.13

(21) 申请号 200910085981.3

(22) 申请日 2009.06.10

(73) 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院
微生物流行病学研究所

地址 100071 北京市丰台区东大街 20 号

(72) 发明人 王慧 侯晓军 王琴 包士中
蔡昆 史晶 荫俊

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(56) 对比文件

CN 1438245 A, 2003.08.27, 全文.

US 2002012658 A1, 2002.01.31, 全文.

CN 101357942 A, 2009.02.04, 全文.

邢洪光. 志贺毒素基因克隆表达及其免疫学活性研究. 《中国人民解放军军事医学科学院硕士学位论文》. 2003, 中文摘要, 第 34-37 页.

审查员 奚静

(51) Int. Cl.

C07K 16/12 (2006.01)

C07K 16/02 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

A61P 39/02 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

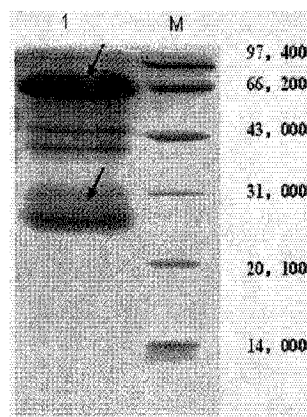
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种抗 I 型志贺毒素 IgY 抗体、及其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明公开了一种抗 I 型志贺毒素的 IgY 抗体, 该抗体可以通过以下方法制备: 化学合成或基因重组表达的方法制备无毒性的志贺毒素免疫抗原, 通过免疫产蛋鸡, 收集鸡蛋, 应用生物化学方法提取和纯化卵黄免疫球蛋白 (IgY 抗体)。该抗体具有中和志贺毒素, 有效抑制志贺毒素毒性的效应, 可以作为口服抗毒素用于由产毒志贺菌、肠出血性大肠杆菌 0157、霍乱弧菌等感染引起的并发症的预防和治疗, 同时可应用于 I 型志贺毒素及其病原菌的检测和感染诊断。



1. 一种抗志贺毒素的 IgY 抗体,其特征在于:该抗体特异识别 I 型志贺毒素;

所述抗志贺毒素 IgY 抗体按照如下方法制备:

- (1) 重组制备 I 型志贺毒素抗原,所述 I 型志贺毒素抗原为 I 型志贺毒素 B 亚单位;
- (2) 应用 I 型志贺毒素抗原多次加强免疫产蛋鸡;
- (3) 收集鸡蛋,分离出蛋黄,提取卵黄免疫球蛋白;

所述多次加强免疫产蛋鸡的方法如下:

第一次免疫:免疫时间为 0d;免疫剂量为 1mg/只;

第二次免疫:免疫时间为 14d;免疫剂量为 1mg/只;

第三次免疫:免疫时间为 28d;免疫剂量为 0.5mg/只;

第四次免疫:免疫时间为 42d;免疫剂量为 0.5mg/只;

所述 I 型志贺毒素 B 亚单位是用工程菌株 pBV220-stx1b/DH5 α 表达得到的。

2. 权利要求 1 所述抗志贺毒素 IgY 抗体的制备方法,包括如下步骤:

- (1) 重组制备 I 型志贺毒素抗原,所述 I 型志贺毒素抗原为 I 型志贺毒素 B 亚单位;
- (2) 应用 I 型志贺毒素抗原多次加强免疫产蛋鸡;
- (3) 收集鸡蛋,分离出蛋黄,提取卵黄免疫球蛋白;

所述多次加强免疫产蛋鸡的方法如下:

第一次免疫:免疫时间为 0d;免疫剂量为 1mg/只;

第二次免疫:免疫时间为 14d;免疫剂量为 1mg/只;

第三次免疫:免疫时间为 28d;免疫剂量为 0.5mg/只;

第四次免疫:免疫时间为 42d;免疫剂量为 0.5mg/只;

所述 I 型志贺毒素 B 亚单位是用工程菌株 pBV220-stx1b/DH5 α 表达得到的。

一种抗 I 型志贺毒素 IgY 抗体、及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种 IgY 抗体,具体说涉及一种特异抗 I 型志贺毒素的 IgY 抗体,还涉及该抗体的制备方法及用途。

背景技术

[0002] 志贺毒素 (Shiga Toxin, Stx) 作为肠道病原菌产生的一类具有肠毒性、细胞毒性和神经毒性的细菌外毒素,是急性细菌性痢疾、霍乱 0139、0157:H7 等新发肠道病原菌最为关键的强致病毒力因子。临床上引起出血性结肠炎 (hemorrhagic colitis, HC)、血栓形成性血小板减少性紫癜 (TTP) 以及病死率高达 80~90% 的溶血性尿毒症 (hemolytic uremic syndrome, HUS) 等严重并发症,每年全球数百万人患此类疾病。

[0003] 目前针对志贺毒素尚无特异有效的预防产品和急救治疗药物。临床普遍采用的抗生素治疗主要针对的是产毒病原菌,已经引起多重耐药菌株的出现,造成抗生素治疗的失效。抗生素使用造成更加不利的后果是菌体崩解引发志贺毒素过量释放,加大了由毒素引发各种并发症的风险。因此针对志贺毒素相关疾病的治疗主张慎用抗生素,而应寻求特异性拮抗药物作为新的有效治疗手段。

[0004] I 型 Stx (Stx1) 由 1 个志贺毒素 A 亚单位 (StxA) 和 5 个志贺毒素 B 亚单位 (StxB) 组成,毒素通过 StxB 介导与真核细胞表面的 Gb3 受体结合,进而 StxA 作用于细胞 28S rRNA 引起细胞病变。StxB 与细胞 Gb3 受体的结合是毒素发挥作用的起始关键环节,如能阻断这种结合,将从根本上抑制 Stx 分子毒性的发挥。研究方向主要集中在毒素受体类似物和抗体治疗方面。Kitov, PI. 报道了能与 Stx 结合的多糖化合物,具有潜在的治疗应用价值 (Kitov PI, Sadowska JM, Mulvey Get al. Shiga-like toxin are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands. Nature 2000. 403 :669-672.) ;2002 年 Natori Y. 报道了 Gb3 受体治疗的实例 (Natori Y. New drugs that prevent cytotoxicity of Shiga toxins. Nippon Rinsho. 2002. 60(6) :1131-1137.), 包括一种能在胃肠道途径阻止毒素扩散的新制剂和另一种可在循环系统抑制志贺毒素毒性的水溶性制剂。但是受体类多糖化合物的复杂制备工艺和副作用成为制约其发展的障碍。最近,有学者报道可表达毒素模拟受体的益生菌具有显著的毒素中和效果,可用于治疗志贺毒素 (Paton AW, Morona R, Paton JC. A new biological agent fortreatment of Shiga toxigenic Escherichia coli infections and dysentery in humans. NatMed. 2000. 6(3) :257-8.) 及破伤风类疾病,但是这种活菌治疗的安全性有待进一步考察和验证 (Paton AW et al, 2000 ;Focareta A et al, 2006)。在抗体治疗方面, Nakao, H 等研究报道的单克隆抗体能够阻断 Stx 与细胞受体的结合,中和 Stx 细胞毒性 (Nakao H, Kataoka C, Kiyokawa N et al. Monoclonal antibody to Shiga toxin 1, which blocks receptor binding and neutralizes cytotoxicity. Microbiol. and Immunol. 2002. 46(11) :777-780.) ;2004 年 Inoue, KI (Inoue KI, Itoh K, Nakao H et al. Characterization of a Shiga toxin 1-neutralizing recombinant Fab fragment isolated by phage display system. Tohoku

J. Exp. Med. 2004. 203 :295-303.) 利用噬菌体展示技术筛选获得具有 Stx 毒性中和效应的重组 Fab 抗体片段。但临床应用有待于重组抗体制备工艺的改进完善。

[0005] IgY 抗体,即卵黄免疫球蛋白 (Egg yolk immunoglobulin),最早由 Williams 等人于 1962 年发现存在于禽类的卵黄中,具有许多其它哺乳动物抗体都无法比拟的优点,因为鸡 IgY 不与人类补体、蛋白 A 和类风湿因子结合,在检测应用中具有更高的特异性,而避免了假阴性假阳性反应的出现,成为抗原检测的理想材料。近年来, IgY 抗体已被发展应用于人和畜禽感染性疾病的治疗,1988 年由 Kuhlmann 和 Yolken 等 (Kühlmann R, Wiedemann V, Schmidt P et al. Chicken egg antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. Immunization and antibody determination. Zentralbl Veterinärmed B. 1988 Oct ;35(8) :610-6.) 提出了口服特异性卵黄抗体可以防治肠道细菌与病毒感染。目前国外的人用抗轮状病毒 IgY 抗体、抗沙门氏菌感染的研究已进入临床试验阶段。应用志贺毒素的重组保护性抗原,免疫制备的特异抗志贺毒素的 IgY 抗体,具有功能明确,副作用小,安全性高的特点,可以作为口服制剂等应用于产志贺毒素病原菌感染并发症的预防和治疗,也可以应用于 I 型志贺毒素的检测和相关疾病诊断。IgY 抗体可以大量低成本制备的优势,使其具有广泛的应用前景。目前国内外针对志贺毒素的 IgY 抗体研究未见报道。

发明内容

[0006] 针对志贺毒素抑制剂的缺乏,本发明提供了一种具有特异抗 I 型志贺毒素并有效抑制志贺毒素毒性的 IgY 抗体。

[0007] 该 IgY 抗体分子量为 180000,制备纯度大于 90%,具有较好的稳定性且易于保存、运输。

[0008] 本发明的抗 I 型志贺毒素的 IgY 抗体是通过以下的方法进行制备的。首先通过基因工程技术和分子生物学方法,设计引物,对基因进行表达适应性修饰,制备 Stx1B 基因,构建重组表达 Stx1B 的原核基因工程菌-重组大肠杆菌,然后诱导表达并通过一系列纯化步骤,制备高纯度具有生物学活性的重组 Stx1B 蛋白。动物实验验证结果表明,重组 Stx1B 蛋白可以诱导机体产生高滴度中和抗体,能拮抗致死剂量毒素的攻击,具有完全保护作用。选用产蛋鸡,以重组 Stx1B 为免疫原,通过动物定向免疫方法,在动物体内诱导产生特异抗 I 型志贺毒素的 IgY 抗体。收集产蛋,采用水稀释法、盐析或 PEG 法等提取卵黄免疫球蛋白,可以进一步采用 DEAE 色谱、凝胶过滤或亲和层析分离纯化方法等进行纯化。

[0009] 本发明的 IgY 抗体可以通过本领域已知的生物化学的方法进行大量制备。在 IgY 抗体全分子基础上,可以应用蛋白酶消化方法制备 F(ab)' 等衍生物,以优化改善其理化性质、提高或增加其应用性和应用范围。

[0010] 通过试验测定本发明 IgY 抗体与 I 型志贺毒素特异结合活性,显示其结合态稳定,结合动力学表现优良。在细胞模型上,本发明的 IgY 抗体能够抑制志贺毒素的细胞毒效应,并具有剂量依赖活性。动物试验观察志贺毒素中和作用,结果显示本发明的 IgY 抗体通过中和志贺毒素,可完全抑制志贺毒素的致死毒性,对受试小鼠起到保护作用。

[0011] 通过上述体内和体外试验证实,本发明的 IgY 抗体能通过抑制志贺毒素与宿主细胞受体的结合,具有抑制志贺毒素毒性的生物学效应,具有良好的应用前景,可以提供一种

志贺毒素新的有效治疗剂,应用于志贺毒素所引起相关疾病的治疗,这些疾病包括由产毒志贺菌、肠出血性大肠杆菌 0157 或霍乱弧菌等产生志贺毒素的微生物所引起疾病。

附图说明

[0012] 图 1 为重组大肠杆菌 pBV220-stx1b/DH5 α 诱导表达产物的 SDS-PAGE 图谱,其中 1. 蛋白分子量标准;1 和 2. 重组菌未诱导对照;3. 重组大肠杆菌诱导表达(箭头所指处为目的蛋白)。

[0013] 图 2 为重组 Stx1B 纯化产物的 SDS-PAGE 图谱,其中 1. 纯化后的 Stx1B;M. 蛋白分子量标准。

[0014] 图 3 为制备的 IgY 抗体的电泳分析图,其中 1. IgY 抗体(箭头所指处分别为 IgY 的重链和轻链)M. 蛋白分子量标准。

[0015] 图 4 为 BIAcore 系统动态分析梯度 IgY 与 Stx1B 的特异结合。(图中曲线由上到下分别显示,1 : 20、1 : 40、1 : 80、1 : 160、1 : 320 的 IgY 与 Stx1B 的动态结合情况,结果表明 IgY 能与 Stx1B 发生特异结合,并具有量效关系)。

[0016] 图 5 为 IgY 抗体的志贺毒素体外细胞毒性抑制实验,其中 A. 15 μ g/mL FITC-Stx1B 的细胞结合活性;B. 15 μ g/mL FITC-Stx1B 与 IgY 抗体孵育后的细胞结合活性。

[0017] 图 6 为 IgY 抗体的志贺毒素体外细胞毒性抑制实验,图中显示,与毒素孵育的 IgY 剂量越大,反映活细胞数量的 OD₅₇₀ 越高,说明毒素抑制效应越明显。其中,无关抗体做为对照。

具体实施方式

[0018] 实施例 1 重组 Stx1B 的表达与纯化

[0019] 1. 材料

[0020] 1.1 菌株

[0021] 工程菌株 pBV220-stx1b/DH5 α 由本实验室构建,用于外源蛋白 Stx1B 表达。

[0022] 1.2 试剂

[0023] 离子交换层析柱 SepharoseTM HP HTrapTM 和 Sephacry S-100 凝胶柱(26/100)购自 GE 公司。

[0024] 2. 方法与结果

[0025] 2.1 重组 StxB 在大肠杆菌中的诱导表达

[0026] 将工程菌株 pBV220-stx1b/DH5 α 接种至含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基,37℃振荡过夜,次日以 1 : 100 接种至 LB 液体培养基,继续在 37℃振荡培养,至菌液浓度达到 OD₆₀₀ 为 0.8 ~ 1.0,迅速提高温度至 41℃,继续培养 5h。4℃ 5000g 离心 10min,以预冷的 PBS 洗菌体一次,离心收集菌体,待超声破碎。

[0027] SDS-PAGE 分析:收集经过 41℃温度诱导的重组菌体进行 SDS-PAGE 电泳,结果显示重组菌体样品中出现分子量为 7.7kD 的蛋白条带,与 Stx1B 预期分子量相符,凝胶扫描分析显示重组蛋白占总蛋白量 20%左右(附图 1)。

[0028] 2.2 重组 Stx1B 的纯化

[0029] 将离心收集的菌体用缓冲液 A(20mM Tris-HCl,10mM NaCl,1mM EDTA, pH7.4)悬

浮,置于冰浴中超声波破碎菌体,每次 300W 超声波处理 20s,间隙 10s,90 个循环。破碎后的菌体悬液 4℃ 10000g 离心 10min。上清缓慢滴加饱和硫酸铵溶液至 30% 浓度,边滴加边搅拌,4℃ 静置 4h 以上,4℃ 10000g 离心 10min,上清继续滴加饱和硫酸铵至 80% 浓度,4℃ 静置 4h 以上,4℃ 10000g 离心 10min,沉淀以缓冲液 A 复溶。复溶物装入透析袋(截流分子量 3.5kD),4℃ 下搅拌以缓冲液 A 透析,4h 换液一次,共 4 次。4℃ 10000g 离心 10min,弃沉淀,留取上清。

[0030] 透析后的样品进行离子交换层析。上样前以缓冲液 A 平衡 QSepharose™ HP HTrap™ 柱,2mL/min 上样后仍以缓冲液 A 平衡,以缓冲液 B(20mM Tris-HCl,1M NaCl,pH7.4,) 线性梯度洗脱,60min 内缓冲液 B 升至 100% 浓度,收集 280nm 洗脱峰,SDS-PAGE 鉴定目的蛋白峰位。

[0031] 将离子交换层析收集获得的 Stx1B 样品,加样至 Sephacry S-100 凝胶柱(26/100),以 10mM PBS(pH7.4) 洗脱,流速 0.5mL/min,收集 280nm 洗脱峰,SDS-PAGE 鉴定目的蛋白峰位。Stx1B 纯化的 SDS-PAGE 分析见附图 2。

[0032] 实施例 2 抗 I 型志贺毒素 IgY 抗体的制备

[0033] 1. 材料

[0034] 产蛋来航鸡由北京实验动物中心提供,完全和不完全佐剂均购自 Sigma 公司。

[0035] 2. 方法与结果

[0036] 2.1 动物免疫(表 1)

[0037] 将纯化的重组 Stx1B 与福氏佐剂(羊毛脂:液体石蜡=1:3,高压灭菌后备用)等体积混合,搅拌均匀后免疫 SPF-2 级蛋鸡,初次免疫时添加 1mg/ml 卡介苗(中国药品生物制品检定所)。

[0038] 表 1 动物免疫实施

[0039]

免疫时间	免疫剂量	免疫佐剂	免疫途径
0d	1mg/ 只	福氏完全佐剂	皮下、肌肉多点注射
14d	1mg/ 只	福氏不完全佐剂	皮下、肌肉多点注射
28d	0.5mg/ 只	福氏不完全佐剂	皮下、肌肉多点注射
42d	0.5mg/ 只	福氏不完全佐剂	皮下、肌肉多点注射

[0040] 2.2 IgY 抗体的提取

[0041] 将免疫来航鸡所产鸡蛋于消毒液中浸泡 15 分钟,灭菌纱布拭净。去蛋青留取蛋黄,按 1:8 的体积比加入灭菌蒸馏水(pH4.2-4.4),充分搅拌均匀,4℃ 静置过夜。移液管小心吸取上清液,滴加饱和硫酸铵溶液至终浓度 20% 并搅拌均匀,4℃ 静置 4 小时以上。10000g 离心 10 分钟后吸取上清液,向其中继续滴加饱和硫酸铵溶液至终浓度 40% 并搅拌均匀,4℃ 静置过夜。10000g 离心 15 分钟,去尽上清,沉淀重溶于 10mM PBS(pH7.4) 溶液中,经 10mM PBS(pH7.4) 透析后,即为提取的 IgY。对提取的 IgY 进行 SDS-PAGE 分析,结果显示提取的抗体纯度大于 80% (附图 3)。

[0042] 2.3 IgY 抗体效价的动态检测 (ELISA)

[0043] 以重组 Stx1B 和 I 型志贺毒素分别包被酶联板,每孔 10ng,ELISA 方法检测 IgY 效价,二抗为 HRP 标记兔抗鸡抗体 (SIGMA 公司)。结果显示,随着免疫次数增加,抗体效价呈明显上升趋势,经四次免疫后,抗体效价可达 5.12×10^5 ,在免疫结束后一年效价保持稳定 (表 2)。

[0044] 表 2 抗 Stx1 特异 IgY 效价的测定

[0045]

取样时间点	效价 /mg
10d	1.6×10^2
24d	3.2×10^3
38d	6.4×10^4
52d	5.12×10^5
150d	5.12×10^5
250d	5.12×10^5
350d	5×10^5

[0046] 实施例 3 IgY 抗体在志贺毒素检测中的应用

[0047] 1. 材料

[0048] BIAcore 3000 生物传感器系统及 CM5 芯片、耦联试剂、工作液等均为 GE 公司产品,抗 IgY-HRP 购自 SIGMA 公司。酶联板及显色试剂购自百奥康公司。

[0049] 2. 方法与结果

[0050] 2.1 IgY 抗体与 Stx1B 结合特异性 (ELISA)

[0051] 以 I 型志贺毒素 (Stx1)、II 型志贺毒素 (Stx2)、破伤风毒素 (Tet)、金葡菌肠毒素 B (SEB) 等抗原分别包被酶联板,每孔 $10 \mu\text{g}$,ELISA 方法检测 IgY 的结合活性,二抗为 HRP 标记兔抗鸡抗体 (SIGMA 公司)。结果显示,IgY 抗体能够特异识别 I 型志贺毒素,发生明显结合作用,而与其他毒素抗原 (破伤风毒素 -Tet,金葡菌肠毒素 B-SEB) 不结合,特别是与 II 型志贺毒素 (Stx2) 无明显交叉反应 (表 3),表明 IgY 抗体特异性良好,可以用于 I 型志贺毒素的检测。

[0052] 表 3 IgY 抗体与 Stx1 的结合特异性

[0053]

组别	Stx1	Stx2	Tet	SEB	BSA
OD ₄₅₀	0.507	0.049	0.051	0.046	0.069

[0054] 2.2 IgY 抗体与 Stx1B 特异结合的动态分析

[0055] 借助 BIAcore 生物传感器系统,测定 IgY 抗体与 Stx1B 特异结合活性。将 Stx1B 偶联到芯片 CM5 上,偶联量为 785RU,以 EDC/NHS 活化和乙醇胺封闭。测定不同浓度的 IgY

抗体与 Stx1B 结合的动力学常数。检测流速在 $20 \mu\text{L}/\text{min}$ 下进行,由 Sensorgram 记录曲线观察 IgY 抗体的动态结合过程。结果显示, IgY 抗体与作为对照通道 (Fc1) 的无关蛋白结合的 RU 值为 9.8,不同浓度 IgY 抗体与 Stx1B 结合的 RU 值,随着 IgY 抗体浓度的逐渐增加 (1 : 320、1 : 160、1 : 80、1 : 40、1 : 20), IgY 抗体与 Stx1B 偶联通道 (Fc2) 的结合量也随之升高, RU 值分别为 34.5、65.6、103.5、132.3、158.1。附图 4 所示的结合动态曲线反映出了不同浓度 IgY 抗体与 Stx1B 结合的动态过程, IgY 抗体呈现了较快速的结合 (图中“结合区”所示结合曲线上升趋势明显), 并且解离的很缓慢, (图中“解离区”所示解离曲线没有明显下降趋势), 其结合态稳定, 结合动力学表现优良。表明 IgY 抗体可以用于 I 型志贺毒素的检测。

[0056] 实施例 4 抗 I 型志贺毒素 IgY 抗体的体内外中和活性

[0057] 1. 材料

[0058] Balb/C 小鼠由军事医学科学院动物中心提供, 菌株 S. dys 51054 购自中国药物生物制品检定所, 抗 Stx1 抗体购自 Biodesign 公司 (ELISA 效价为 1 : 200)。

[0059] 2. 方法与结果

[0060] 2.1 IgY 抗体对 I 型志贺毒素的靶细胞结合抑制效应

[0061] 2.1.1 FITC 标记 Stx1B 的制备

[0062] 将纯化的 Stx1B 以碳酸盐缓冲液 (pH9.2) 透析过夜, 透析后的蛋白移入小烧杯, 加入用二甲亚砜 (DMSO) 溶解的 FITC (1mg FITC/1ml DMSO, 0.05mg FITC/mg Stx1B), 室温下用磁力搅拌器避光搅拌 2h 后以 PBS 透析, 换液数次直到不再由 FITC 析出。

[0063] 2.1.2 IgY 抗体对毒素与细胞受体结合的抑制效应

[0064] 将制备的 $5 \mu\text{g}$ FITC-Stx1B 与 IgY 混合均匀, 避光于 4°C 过夜孵育, 以 PBS 孵育组为阴性对照。在 DMEM (10% FBS) 中培养 HeLa 细胞, 待细胞铺满培养瓶底, 弃去培养液, 贴壁的 HeLa 细胞经胰酶适当消化后弃去消化液, 以培养液吹打培养瓶壁, 使松散的细胞脱落, 调整细胞浓度至 $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6/\text{ml}$ 制备成细胞悬液。向每毫升细胞悬液中加入 FITC-Stx1B 与抗体的孵育物, 37°C 避光作用 2h 后, 1000rpm 离心 5min, 弃去上清, PBS 洗涤后 1000rpm 离心 5min, 细胞沉淀以 4% 的多聚甲醛于 4°C 固定 15min 后, 1000rpm 离心 5min, 沉淀以 PBS 悬浮。采用流式细胞术, 通过检测 FITC 强度反映抗体孵育对 Stx1B 细胞结合活性的影响。结果显示 FITC-Stx1B 与 IgY 孵育后, Stx1B 与细胞的结合活性受到抑制, 荧光强度明显下降, 提示 IgY 能够较好地阻断 Stx1B 与细胞结合 (附图 5)。

[0065] 2.2 IgY 抗体的细胞毒性抑制效应

[0066] 2.2.1 志贺毒素作用 HeLa 细胞模型的建立

[0067] 取新培养的细胞加入 96 孔培养板, 待细胞铺满平板底 90% 面积, 分别加入不同剂量的志贺毒素, 以不作处理的细胞为对照, 培养 12h。用新鲜培养液洗涤各孔 2 次, 每孔加含 $50 \mu\text{g}$ MTT 的培养液 $100 \mu\text{L}$, 继续培养 3h。用 10mmol/L PBS (pH7.2) 洗涤 2 次, 每孔加入含 40mmol/L HCl 的异丙醇 $100 \mu\text{L}$, 室温 30min, 溶解形成颗粒。酸化异丙醇调零, 570nm 处测定各孔吸光值。根据观察结果, 毒素处理细胞 12h 后, 细胞出现明显病变, 细胞边缘模糊, 折光率下降, 活细胞数量减少。确定 $5 \mu\text{L}$ 毒素是合适的细胞染毒实验剂量。

[0068] 2.2.2 细胞毒性抑制实验

[0069] 取 $5 \mu\text{L}$ Stx, 分别与 $5 \mu\text{g}$ 、 $10 \mu\text{g}$ 、 $20 \mu\text{g}$ 、 $40 \mu\text{g}$ 、 $80 \mu\text{g}$ 、 $160 \mu\text{g}$ 、 $320 \mu\text{g}$ 、 $640 \mu\text{g}$ 的

IgY 抗体 4℃ 孵育过夜。按照上述模型,待培养的 HeLa 细胞长至平板 90% 满时,小心吸去培养液,加入含上述混合物的新鲜培养液 200 μ L,细胞于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中孵育 12h 后,MTT 法测定活性细胞数量。

[0070] 实验结果显示,正常未作处理的细胞,MTT 法测得 570nm 处吸光值为 2.163;毒素处理的细胞吸光值为 0.272,对细胞具有明显的细胞毒效应。各实验组细胞,随 IgY 浓度的加大,吸光值逐渐提高,反应活性细胞的数量增多趋势,表明 IgY 对毒素毒性有抑制作用,并随浓度的增加而加强,表现出剂量依赖的量效关系。当 IgY 剂量达到 17.5 μ M 时,可以完全抑制志贺毒素的细胞毒效应,其 IC₅₀ 为 0.428 μ M(附图 6)。实验中,没有观察到 IgY 本身对细胞的毒副作用。

[0071] 2.3 IgY 抗体的志贺毒素体内中和效应

[0072] 2.3.1 志贺毒素粗制品的制备

[0073] 接种 S. dys 51054 于 LB 培养基过夜培养,次日按 1 : 100 接种至 1L 培养基,震荡培养 72h,5000rpm 离心 10min。菌体沉淀悬于 PBS 缓冲液,超声波破碎细胞,10000rpm 离心 10min,上清滴加饱和硫酸铵溶液至 50% 浓度,收集盐析沉淀,以 PBS 溶解并透析完全,得到志贺毒素粗制产物。

[0074] 2.3.2 IgY 抗体的志贺毒素体内中和实验

[0075] 将 5LD₅₀(约 65 μ l) I 型志贺毒素与不同浓度的 IgY 抗体分别混合至 1ml,4℃ 孵育过夜。按照 IgY 抗体使用剂量的不同,将小鼠分为 4 组,每组 12 只;另设阴性对照组,即以 PBS 与志贺毒素混合;PBS 空白对照组,即单独注射 PBS。各组混合液体按照腹腔注射的方法,对小鼠进行攻毒,观察 7d 存活状况。结果显示,阴性对照组中,全体小鼠在 48h 内全部死亡;空白对照组中,小鼠在 7d 观察期内,无死亡发生。实验组中,低剂量组小鼠出现眼睛闭合、皮毛耸立、四肢无力、不进食等志贺毒素中毒症状,严重程度与 IgY 使用剂量呈反比。IgY 抗体剂量为 0.4mg 时,小鼠存活率为 8.3% (1/12);浓度升至 1.2mg,小鼠存活率为 41.67% (5/12);浓度达到 3.6mg 时,小鼠全部存活。结果证实,IgY 抗体与志贺毒素孵育中和后,较好地抑制了志贺毒素的毒性,对受试小鼠起到保护作用,结果见表 4。

[0076] 表 4 :IgY 抗体的志贺毒素体内中和实验

[0077]

组别	小鼠存活数(只)	存活率(%)
PBS	12/12	100
Stx1	0/12	0
0.2mg IgY+ Stx1	0/12	0
0.4mg IgY+ Stx1	1/12	8.33
1.2mg IgY+ Stx1	5/12	41.67
3.6mg IgY+ Stx1	12/12	100

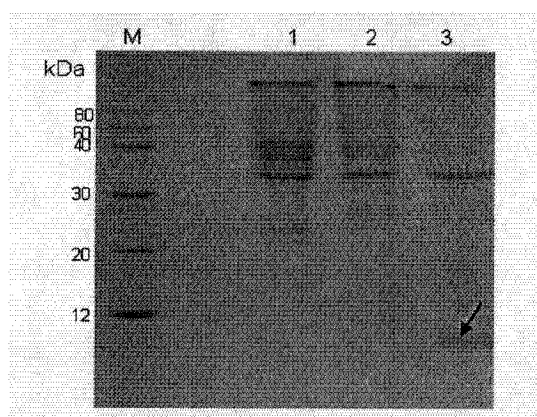


图 1

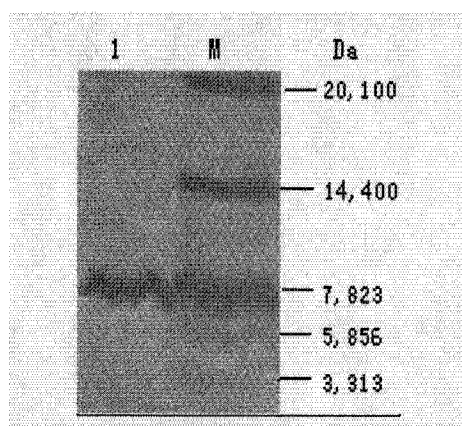


图 2

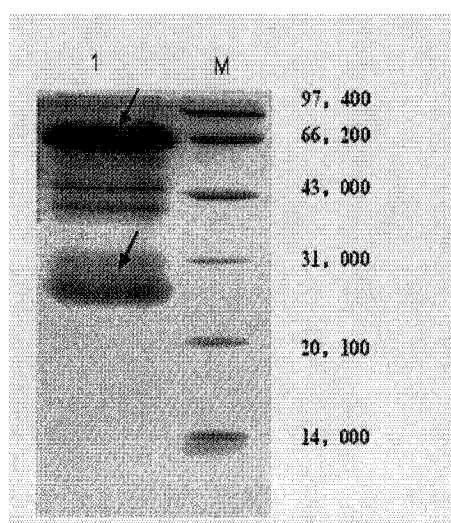


图 3

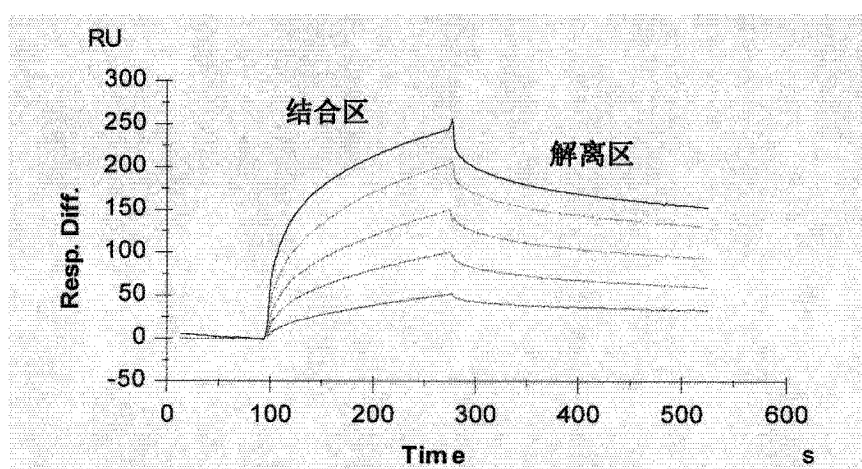


图 4

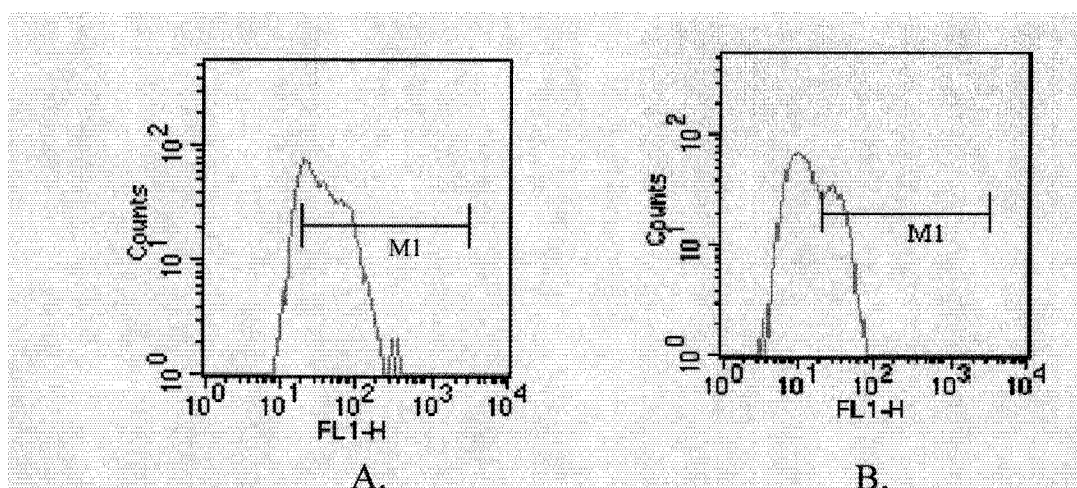


图 5

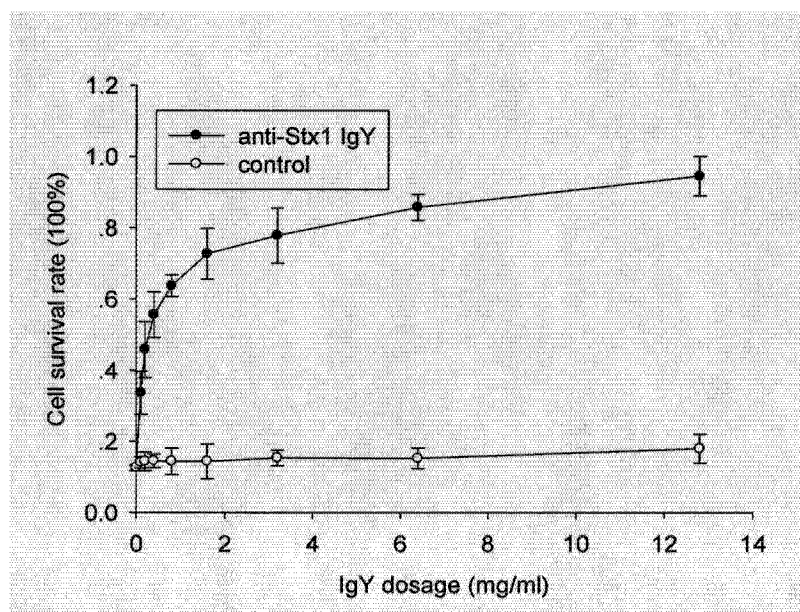


图 6

专利名称(译)	一种抗I型志贺毒素IgY抗体、及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN101570574B	公开(公告)日	2012-06-13
申请号	CN200910085981.3	申请日	2009-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病研究所		
[标]发明人	王慧 侯晓军 王琴 包士中 蔡昆 史晶 荫俊		
发明人	王慧 侯晓军 王琴 包士中 蔡昆 史晶 荫俊		
IPC分类号	C07K16/12 C07K16/02 C07K1/14 C12P21/08 A61K39/40 A61P39/02 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	Y02A50/474		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101570574A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种抗I型志贺毒素的IgY抗体，该抗体可以通过以下方法制备：化学合成或基因重组表达的方法制备无毒性的志贺毒素免疫抗原，通过免疫产蛋鸡，收集鸡蛋，应用生物化学方法提取和纯化卵黄免疫球蛋白(IgY抗体)。该抗体具有中和志贺毒素，有效抑制志贺毒素毒性的效应，可以作为口服抗毒素用于由产毒志贺菌、肠出血性大肠杆菌O157、霍乱弧菌等感染引起的并发症的预防和治疗，同时可应用于I型志贺毒素及其病原菌的检测和感染诊断。

