

抗中间普氏菌卵黄抗体的制备及其对实验性妊娠期龈炎的预防作用

王晓静^{1,2}, 徐燕^{1,2}, 孟明理^{1,2}, 程婷³, 叶兴如^{1,2}, 庞罡^{1,2}, 周永敏^{1,2}, 周乐春³, 沈继龙⁴, 王荣海³

摘要 目的 制备并纯化抗中间普氏菌卵黄抗体(抗 *P. intermedia*-IgY), 观察其对大鼠实验性妊娠期龈炎的预防作用。方法 厌氧培养 *P. intermedia* 菌, 2% 甲醛灭活, 以终浓度为 1×10^9 CFU/ml 的 *P. intermedia* 菌, 1 ml (0.5 ml 菌液 + 0.5 ml 佐剂) /次, 免疫蛋鸡 4 次。用卵黄分离器去除蛋清, 无菌注射器刺破卵黄膜, 收集卵黄液, 两步硫酸沉淀法纯化抗 *P. intermedia*-IgY。SDS-PAGE 凝胶电泳、Western blot、ELISA 对其分子量及特异性鉴定, 并检测免疫后效价变化。将 30 只雌性 SD 大鼠, 15 只雄性 SD 大鼠, 雌: 雄 = 2: 1, 合笼获得 24 只孕鼠, 随机分为 4 组: 0.12% 氯己定孵育组, 抗 *P. intermedia*-IgY 孵育组, 生理盐水孵育组, 空白对照组, 观察抗 *P. intermedia*-IgY 对实验性妊娠期龈炎的抑制作用。结果 经 4 次免疫后抗体最高效价为 1: 512 000, 维持 45 d。1 g 卵黄经两步硫酸沉淀后得 IgY 约 18 mg。SDS-PAGE 凝胶电泳显示纯化后 IgY 纯度达 64.5%。Western blot 显示抗 *P. intermedia*-IgY 识别并特异性结合 *P. intermedia* 菌裂解片段。动物实验观察见 0.12% 氯己定孵育组及抗 *P. intermedia*-IgY 孵育组牙龈指数显著低于生理盐水孵育组 ($P < 0.01$), 而两者之间牙龈指数差异无统计学意义。牙龈组织病理学观察显示抗 *P. intermedia*-IgY 孵育组牙龈的炎症状态轻于生理盐水孵育组。结论 经 4 次免疫后可得到持续高效价的抗 *P. intermedia*-IgY, 且抗 *P. intermedia*-IgY 能够减轻大鼠实验性妊娠期龈炎的炎症状态, 对大鼠实验性妊娠期龈炎有一定的预防作用。

关键词 中间普氏菌; 卵黄抗体; 妊娠期龈炎

中图分类号 R 781.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)08-1154-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.012

2017-04-06 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1408085MK128); 安医大安科生物校企合作项目(编号: K2015011)

作者单位: ¹ 安徽医科大学口腔医学院, 合肥 230032

² 安徽医科大学附属口腔医院, 安徽省口腔疾病研究中心实验室, 合肥 230032

³ 安徽安科生物工程(集团)股份有限公司, 合肥 230032

⁴ 安徽医科大学人兽共患病安徽省重点实验室, 合肥 230032

作者简介: 王晓静, 女, 硕士研究生;

徐燕, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 173236344@qq.com

妊娠期龈炎是妇女在怀孕期间的一种常见病、多发病, 其发病率可达 30% ~ 100%^[1]。横断面研究^[2-4]显示在加纳、泰国、巴西其发病率分别达到 89%、86.2%、47%。妊娠期妇女若患牙周疾病, 会影响胎儿的正常发育, 甚至引起早产和低出生体重儿^[5-7]。

对于妊娠期龈炎患者, 妊娠期正确的牙周治疗会缓解牙龈炎症, 维护妊娠期妇女的健康, 提高胎儿的出生率^[8-9]。但是由于妊娠期, 全身药物难以使用, 而且治疗存在局限性, 如去除局部刺激操作较困难, 超声洁治禁止使用, 只能使用手工洁治、刮治, 姑息治疗; 有时会使用一些刺激性小、不含抗菌药的制剂局部处理, 如雅皓乳膏、中药玉女煎、烘干的饮片、玄菊解毒凝胶、中药蚕砂等, 但是这些中药制剂成分复杂, 不具有针对性, 因此很有必要开发一种特异性抑制妊娠期龈炎龈下优势菌-中间普氏菌(*Prevotella intermedia*, *P. intermedia*)的生物制剂, 来避免或减轻妊娠期龈炎。卵黄抗体(immunoglobulin of egg yolk, IgY)是由禽类血清进入到卵黄中的免疫球蛋白 G, 可根据需要采用不同抗原免疫产蛋鸡, 制备特异性 IgY。该实验的目的是制备并纯化抗 *P. intermedia*-IgY, 观察其对大鼠实验性妊娠期龈炎的预防作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料和设备 白航鸡 30 只(隔离饲养至 150 d, 安徽医科大学动物实验中心); PVDF(美国 Millipore 公司); SPF 级 SD 大鼠雌性 30 只(8 ~ 10 周龄)、雄性 15 只(8 ~ 10 周龄)(安徽医科大学动物实验中心); 完全弗氏佐剂(Freund's complete adjuvant, FCA)、不完全弗氏佐剂(Freund's incomplete adjuvant, FIA)(美国 Sigma 公司); *P. intermedia*(ATCC25611, 日本微生物菌种保藏中心); 哥伦比亚血琼脂培养基(江门凯林贸易有限公司); PYG 液体培养基基础(PYG Broth Medium Base, 青岛海博生物技术有限公司); DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司); PCR 预混合溶液(PCR Master

Mix, 美国 Thermo scientific 公司); 辣根过氧化物酶标记的羊抗鸡 IgY (SC-2428 HRP-IgY, 美国 Santa cruz 公司); 氯化血红素、维生素 K1 (青岛海博生物技术有限公司); 厌氧培养箱 (DG250 Anaerobic workstation, 英国 Don Whitley Scientific 公司); 凝胶图像处理系统 1600 (GIS) (上海天能科技有限公司); 生物安全柜 (美国 Esco 公司); 正倒置显微镜 (日本 Nikon 公司); 普通 PCR 仪 (德国 Biometra 公司)。

1.2 *P. intermedia* 的培养、鉴定和保存

1.2.1 *P. intermedia* 的培养 按照日本微生物保藏中心说明复苏菌种。将 *P. intermedia* 菌冻干粉, 接种于哥伦比亚血琼脂培养基中, 置于厌氧培养箱中 (混合气比例: 800 ml/L N₂、100 ml/L CO₂、100 ml/L H₂), 37 °C 培养 5~7 d, 观察有无特征性黑色菌落生成。将特征性黑色菌落接种于 PYG 液体培养基中 (加入 10 μg/ml 维生素 K₁ 及 50 μg/ml 氯化血红素), 增菌培养 48 h, 4 000 r/min, 离心 10 min 收集菌体。

1.2.2 *P. intermedia* 的鉴定 挑取特征性黑色菌落进行革兰氏染色, 并按照试剂盒说明提取细菌 DNA, 根据 *P. intermedia* 的 16s rRNA 引物: *P. intermedia*-F: 5'-TCAACATCTCTGTATCCTGCGT-3'; *P. intermedia*-R: 5'-TTTGTGGGGAGTAAAGCGGG-3' 进行鉴定, 分子量大小为 575 bp。

1.2.3 *P. intermedia* 的保存 挑取黑色的单克隆菌落, 接种于 50 ml PYG 液体培养基中, 37 °C, 厌氧培养 12 h 后, 将菌悬液与菌种保存液按 1:1 比例混合, 分装标记后于 -80 °C 保存。

1.3 蛋鸡免疫

1.3.1 抗原制备 2% 甲醛灭活 *P. intermedia* 菌体, 4 °C 过夜, 无菌 PBS 洗 3 次, 终浓度为 1 × 10⁹ CFU/ml。取 1 ml 菌悬液与等量的佐剂进行混合乳化 30 min, 最终成油包水状, 用于蛋鸡免疫。

1.3.2 免疫 将 30 只蛋鸡分 2 组: 对照组 10 只, 实验组 20 只。实验组免疫 4 次 (第 1、2、3 次间隔 10 d, 第 4 次间隔 30 d), 对照组不处理。经肌肉浅层多点注射乳化后 *P. intermedia* 菌抗原 (第 1 次用 FCA, 第 2、3、4 次用 FIA), 1 ml/只。初次免疫后开始收集 2 组鸡蛋, 标记后 4 °C 保存。

1.4 特异性 IgY 的纯化和鉴定

1.4.1 IgY 的纯化 按照课题组前期研究方法^[10] 即两步硫酸沉淀法提纯 IgY, 并将纯化后的 IgY 分装标记后于 -20 °C 保存。

1.4.2 Lowry 法测 IgY 浓度 紫外法粗侧样品蛋白浓度, 将其浓度调整为约 100 μg/ml。将 200 μg/ml 的蛋白标准品, 按照 0、200、400、600、800、1 000 μl 的量加入到试管中, 然后在 6 只试管中加入纯水至 1 ml。按照同样的方法处理样品。然后加入 1 ml 混合液 (Na₂CO₃/NaOH、酒石酸钾、CuSO₄ 按比例混合) 混匀后静置 10 min, 再加入稀释后福林酚试剂 4 ml, 混匀后静置 30 min, 经紫外分光光度计测量样品及标准品在波长 650 nm 时的吸光度值, 绘制标准曲线, 计算样品浓度。

1.4.3 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定 IgY 分子量 非还原型凝胶电泳观察 IgY 总分子量, 分离胶浓度为 7.5%, 浓缩胶浓度为 5%。还原型凝胶电泳观察 IgY 轻链和重链的分子量, 分离胶浓度为 10%, 浓缩胶浓度为 5%。

1.4.4 Western blot 检测 IgY 的特异性 *P. intermedia* 菌悬液经超声破碎, 上样量 20 μg/孔, 行还原型 SDS-PAGE 凝胶电泳 (10% 分离胶, 5% 浓缩胶, 1.5 mm 厚), 转膜 (PVDF 膜, 220 mA, 3.5 h)。5% BSA 封闭, 室温, 2 h。TBST 洗 3 次。孵一抗即待检样品, 4 °C 过夜。TBST 洗 5 次。孵二抗 (1:10 000 倍稀释的羊抗鸡 HRP-IgY), 室温, 2 h。TBST 洗 5 次。显影液 (ECL Western blot Substrate Kit) 显影。

1.4.5 ELISA 法测定特异性 IgY 的效价变化 ELISA 法测定免疫后不同时间点的特异性 IgY 抗体的效价变化。100 倍稀释的 1 × 10⁹ CFU/ml *P. intermedia* 抗原, 100 μl/孔, 4 °C 包被过夜。PBST 洗 3 遍。1% BSA, 270 μl/孔, 37 °C 封闭 2 h。PBST 洗 3 遍。加入一抗即梯度稀释后的待检样品 (原液, 1:2¹, 1:2², 1:2³, 1:2⁴, ……, 1:2¹⁴), 第 16 号孔加入对照组 IgY, 100 μl/孔, 37 °C 孵育 2 h。加入 1:10 000 倍稀释的羊抗鸡 HRP-IgY, 100 μl/孔, 37 °C 孵育 2 h。PBST 洗 5 遍。加入显色液 A 液 50 μl/孔, B 液 50 μl/孔, 37 °C 孵育 10 min。2 mol/L H₂SO₄, 50 μl/孔终止反应。酶标仪上读取波长 450 nm 处的吸光度值。以实验孔值/对照孔值 > 2.1 为阳性结果, 则该孔对应的样品稀释倍数即为特异性 IgY 的效价值。最后绘制效价变化曲线。

1.5 动物实验 30 只雌性 SD 大鼠 (8~10 周龄), 15 只雄性 SD 大鼠 (8~10 周龄), 雌:雄以 2:1 合笼 12 h, 雌鼠经阴道分泌物涂片观察见精子者确认为受孕, 记为孕 0 d。将 24 只孕鼠随机分为 4 组: 0.12% 氯己定孵育组, 抗 *P. intermedia*-IgY 孵育组,

生理盐水孵育组,空白对照组。除空白对照组外,其余3组受孕第2天(孕1 d)进行丝线结扎大鼠第一磨牙,0.12% 氯己定孵育组接种经0.12% 氯己定孵育30 min 后的 *P. intermedia* 菌悬液, 1×10^9 CFU/ml, 0.5 ml/只; 抗 *P. intermedia*-IgY 孵育组接种经抗 *P. intermedia*-IgY 孵育30 min 后的 *P. intermedia* 菌悬液, 1×10^9 CFU/ml, 0.5 ml/只; 生理盐水孵育组接种经生理盐水孵育30 min 后的 *P. intermedia* 菌悬液, 1×10^9 CFU/ml, 0.5 ml/只。每天接种1次,共接种7次。孕8 d时拍照观察大鼠牙龈的形态学改变,检测大鼠牙龈指数,处死大鼠后取牙龈组织,10% 甲醛固定,脱水,包埋,切5 μ m 切片,HE染色,光学显微镜下观察。

1.6 统计学处理 采用SPSS 17.0软件进行分析,实验数据采用表示,用one-way ANOVA 统计分析,两两比较采用SNK- q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *P. intermedia* 菌的培养鉴定 *P. intermedia* 菌在血琼脂上形成圆形、低凸、半透明、表面光滑的溶血菌落,培养一定时间后由于血红素在细菌表面沉积而使菌落变黑(图1)。革兰染色阴性,细菌呈短杆菌。基于16 s rRNA 鉴定,PCR产物为575 bp(图2)。

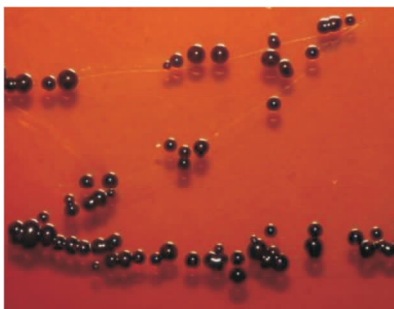


图1 *P. intermedia* 形态学观察结果

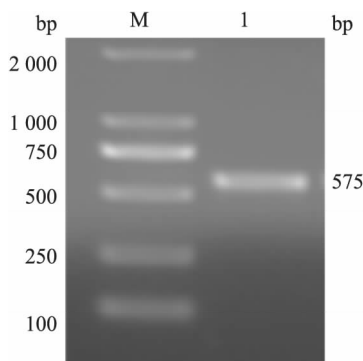


图2 *P. intermedia* 16s rRNA 鉴定结果

M: Marker; 1: *P. intermedia*

2.2 Lowry 法测 IgY 浓度 经检测1 g 卵黄经两步硫酸铵沉淀纯化后可得总IgY 约18 mg。

2.3 SDS-PAGE 凝胶电泳 非还原型凝胶电泳结果显示,两步硫酸铵沉淀法纯化后的IgY,分子量约为180 ku,符合理论值。还原型凝胶电泳结果显示,经 β -巯基乙醇还原裂解后的IgY,含有60~70 ku 的重链和25~30 ku 轻链2条主带,与理论值一致(图3);经GIS软件分析IgY纯度,一步硫酸铵法纯化的IgY纯度为51.5%,两步硫酸法纯化的IgY纯度为56.3%,透析IgY纯度为64.5%(图4)。

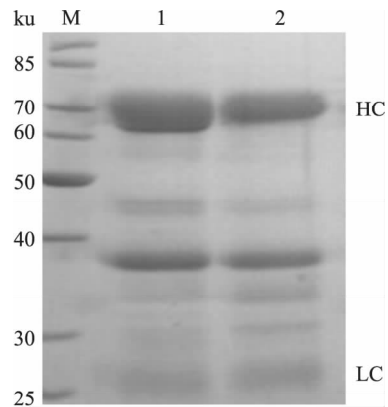


图3 还原型凝胶电泳图

M: Marker; 1,2: 纯化的IgY

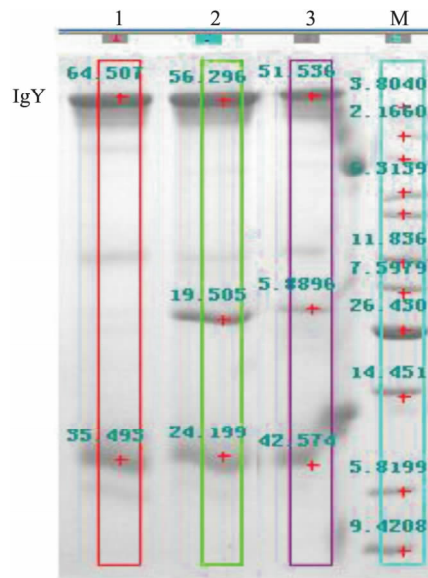


图4 GIS 软件分析后凝胶电泳

1: 透析后 IgY; 2: 两次硫酸铵沉淀 IgY; 3: 一次硫酸铵沉淀的 IgY; M: Marker

2.4 Western blot 检测结果 Western blot 检测结果显示,实验组 IgY 能识别超声破碎后 *P. intermedia* 菌的诸多片段,对照组则 IgY 不能识别(图5)。

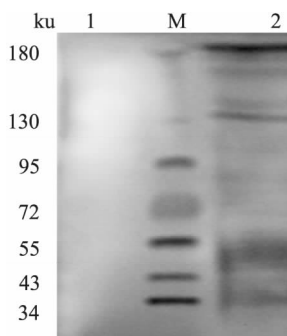


图5 Western blot 检查特异性 IgY 能够识别抗原片段
M: Marker; 1: 对照组 IgY; 2: 实验组 IgY

2.5 ELISA 法测定特异性 IgY 的效价变化 经 4 次免疫后特异性 IgY 的最高效价达 1 : 512 000, 并保持 45 d, 之后抗体效价迅速下降, 在第 4 次免疫后 80 d 效价下降至 1 : 16 000, 并维持在该水平。对照组的抗体效价始终接近 0 (图 6)。以上结果表明实验组 IgY 能够特异性识别并结合 *P. intermedia* 菌抗原。

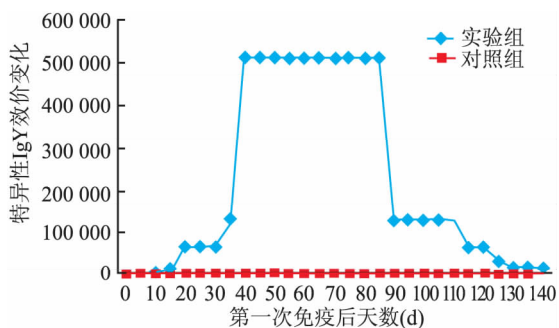


图6 特异性 IgY 随免疫时间的效价变化

2.6 动物实验结果

2.6.1 疑受孕雌鼠阴道分泌物涂片结果 光学显微镜下观察, 视野中见大量精子 (图 7)。

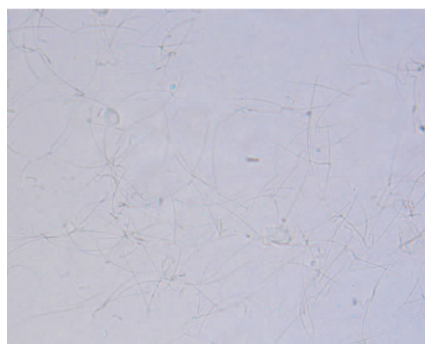


图7 疑受孕雌鼠阴道分泌物涂片 ×5

2.6.2 牙龈形态学观察 造模结束后牙龈形态学观察可见空白对照组牙龈色粉红, 游离龈边缘菲薄。0.12% 氯己定孵育组、抗 *P. intermedia*-IgY 孵育组及生理盐水孵育组牙龈色暗红, 边缘圆钝, 龈沟液增多, 探诊出血, 牙龈呈炎症状态 (图 8)。

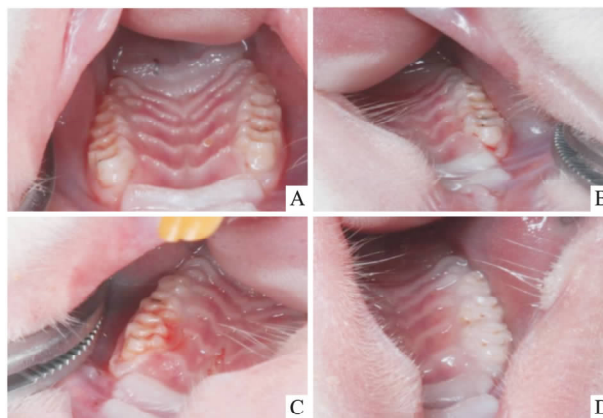


图8 造模结束后各组牙龈形态学观察

A: 0.12% 氯己定孵育组; B: 抗 *P. intermedia*-IgY 孵育组; C: 生理盐水孵育组; D: 空白对照组

2.6.3 牙龈指数 0.12% 氯己定孵育组 ($1.114 6 \pm 0.160 2$)、抗 *P. intermedia*-IgY 孵育组 ($1.135 4 \pm 0.144 8$) 与生理盐水孵育组 ($2.156 3 \pm 0.305 6$) 相比, 差异有统计学意义 ($F = 45.600 0, P < 0.01$), 因此在 $\alpha = 0.05$ 的检验水准上, 可以推测 0.12% 氯己定孵育组和抗 *P. intermedia*-IgY 孵育组牙龈炎症状态轻于生理盐水孵育组。0.12% 氯己定孵育组与抗 *P. intermedia*-IgY 孵育组相比, 牙龈炎症状态差异无统计学意义 (图 9)。

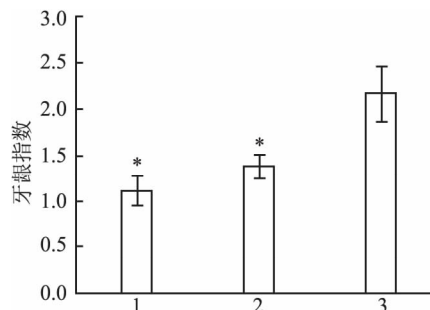


图9 各组牙龈指数结果

1: 0.12% 氯己定孵育组; 2: 抗 *P. intermedia*-IgY 孵育组; 3: 生理盐水孵育组; 与生理盐水孵育组比较: * $P < 0.05$

2.6.4 组织学观察 0.12% 氯己定孵育组和抗 *P. intermedia*-IgY 孵育组牙龈上皮层炎细胞浸润, 钉突多而长, 基底膜细胞排列紊乱, 固有层结缔组织排

列紊乱,炎细胞浸润。生理盐水孵育组牙龈上皮层及固有层大量炎细胞浸润,固有层内有脓肿形成。空白对照组牙龈上皮层基底膜细胞排列整齐,上皮层及固有层未见明显炎细胞浸润(图 10)。

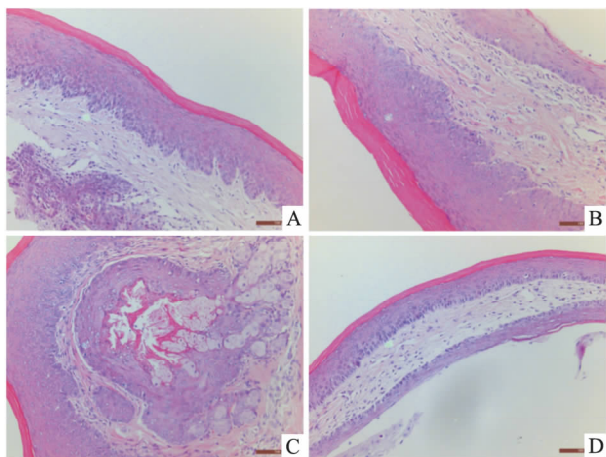


图 10 各组牙龈组织学切片 HE × 20

A: 0.12% 氯己定孵育组; B: 抗 *P. intermedia*-IgY 孵育组; C: 生理盐水孵育组; D: 空白对照组

3 讨论

与产生于哺乳动物的 IgG 相比, IgY 具有许多独特的优点: 使用少量的抗原免疫禽类即可获得大量的质量均一的特异性 IgY, 不激活哺乳动物的补体系统, 不与类风湿因子或 Fc 受体相结合, 生产简便, 产量高, 利于产业化生产^[11] 等。IgY 近年来广泛应用于牙周疾病的被动免疫治疗。Hamajima et al^[12] 用 40 ku 的牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*) 的外膜蛋白 (OMP) 免疫母鸡获得高纯度的 IgY, 发现抗 OMP-IgY 能够抑制 *P. gingivalis* 与戈登氏链球菌的共聚集。Xu et al^[13] 使用甲醛灭活的具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*, *F. nucleatum*) 免疫母鸡制备抗 *F. nucleatum*-IgY, 实验结果显示高效价的抗 *F. nucleatum*-IgY, 与 *P. gingivalis*、*P. intermedia* 有着弱交叉反应; 用抗 *F. nucleatum*-IgY 治疗由 *F. nucleatum* 感染的小鼠实验性牙周炎, 显示抗 *F. nucleatum*-IgY 能够明显抑制小鼠牙槽骨的吸收。

课题组前期经 3 次免疫获得了最高效价为 1 : 25 600 的抗 *P. gingivalis*-IgY, 最高效价可维持 30 d^[10]。在前期研究的基础上本实验针对实验性妊娠期龈炎选择了 *P. intermedia* 菌作为抗原, 并改变免疫间隔, 在第 3 次免疫后的 30 d 进行了一次

加强免疫, 获得了最高效价为 1 : 512 000 的抗 *P. intermedia*-IgY, 最高效价可维持 45 d, 不仅有效提高了特异性 IgY 的效价, 也增加了高效价特异性 IgY 的维持时间, 这对于产品化之后的工业化生产, 具有一定的指导意义。

Hou et al^[14] 用灭活 *P. intermedia* 菌免疫产蛋母鸡, 获得抗 *P. intermedia*-IgY, 并用该特异性抗体治疗由 *P. intermedia* 菌引起的大鼠牙龈炎, 结果显示经抗 *P. intermedia*-IgY 治疗的实验组大鼠的各项指标均优于对照组。但是抗 *P. intermedia*-IgY 对实验性妊娠期龈炎的疗效如何, 尚未见报道。本实验在 Hou et al^[14] 学者研究的基础上首次观察抗 *P. intermedia*-IgY 对大鼠实验性妊娠期龈炎的靶向抑制作用, 实验结果显示抗 *P. intermedia*-IgY 孵育组的各项指标均优于生理盐水孵育组, 抗 *P. intermedia*-IgY 能够有效抑制妊娠期龈炎的发展进程。

Yamanaka et al^[15] 研究发现当 *P. intermedia* ATCC25611 以 1×10^9 CFU/ml 浓度经皮下注射 BALB/c 小鼠腹股沟区连续 3 d 即可观察到明显的脓肿形成, 这也与本实验中生理盐水孵育组病理切片中观察到的微小脓肿形成相吻合。

本实验利用 *P. intermedia* 全菌抗原免疫蛋鸡制备高效价的抗 *P. intermedia*-IgY, 将其作用于大鼠实验性妊娠期龈炎, 可减轻炎症表现, 靶向抑制大鼠实验性妊娠期龈炎的发展进程, 预防大鼠实验性妊娠期龈炎的发生及发展, 为抗 *P. intermedia*-IgY 的大规模生产及应用提供实验依据。

参考文献

- [1] 曹采方. 牙周病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 154 - 6.
- [2] Vogt M, Sallum A W, Cecatti J G, et al. Factors associated with the prevalence of periodontal disease in low-risk pregnant women [J]. Reprod Health, 2012, 9: 3.
- [3] Nuamah I, Annan B D. Periodontal status and oral hygiene practices of pregnant and non-pregnant women [J]. East Afr Med J, 1998, 75(12): 712 - 4.
- [4] Rakchanok N, Amporn D, Yoshida Y, et al. Dental caries and gingivitis among pregnant and non-pregnant women in Chiang Mai, Thailand [J]. Nagoya J Med Sci, 2010, 72(1-2): 43 - 50.
- [5] Babalola D A, Omole F. Periodontal disease and pregnancy outcomes [J]. J Pregnancy, 2010, 2010: 293439.
- [6] Jeffcoat M K, Jeffcoat R L, Tanna N, et al. Association of a common genetic factor, PTGER3, with outcome of periodontal therapy and preterm birth [J]. J Periodontol, 2014, 85(3): 446 - 54.

- [7] Ebersole J L, Holt S C, Cappelli D. Periodontitis in pregnant baboons: systemic inflammation and adaptive immune responses and pregnancy outcomes in a baboon model [J]. J Periodontol Res, 2014, 49(2): 226–36.
- [8] Radnai M, Pál A, Novak T, et al. The possible effect of basic periodontal treatment on the outcome of pregnancy [J]. Fogorv Sz, 2008, 101(5): 179–85.
- [9] Jaramillo A, Arce R, Contreras A, et al. Effect of periodontal therapy on the subgingival microbiota in preeclamptic patients [J]. Biomedica, 2012, 32(2): 233–8.
- [10] 董 瑶,徐 燕,马 倩,等. 抗牙龈卟啉单胞菌卵黄抗体的制备、纯化和生物学特性鉴定 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2015, 25(8): 459–64, +97.
- [11] Dias da Silva W, Tambourgi D V. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2010, 135(3-4): 173–80.
- [12] Hamajima S, Maruyama M, Hijiya T, et al. Egg yolk-derived immunoglobulin (IgY) against *Porphyromonas gingivalis* 40-kDa outer membrane protein inhibits coaggregation activity [J]. Arch Oral Biol, 2007, 52(7): 697–704.
- [13] Xu F X, Xu Y P, Jin L J, et al. Effectiveness of egg yolk immunoglobulin (IgY) against periodontal disease causing *Fusobacterium nucleatum* [J]. J Appl Microbiol, 2012, 113(4): 983–91.
- [14] Hou Y Y, Zhen Y H, Wang D, et al. Protective effect of an egg yolk-derived immunoglobulin (IgY) against *Prevotella intermedia*-mediated gingivitis [J]. J Appl Microbiol, 2014, 116(4): 1020–7.
- [15] Yamanaka T, Yamane K, Furukawa T, et al. Comparison of the virulence of exopolysaccharide-producing *Prevotella intermedia* to exopolysaccharide non-producing periodontopathic organisms [J]. BMC Infect Dis, 2011, 11: 228.

Preparation of egg yolk antibody against *Prevotella intermedia* and its preventive effect on experimental pregnancy gingivitis

Wang Xiaojing^{1,2}, Xu Yan^{1,2}, Meng Mingli^{1,2}, et al

(¹College of Stomatology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Key Lab of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To prepare and purify anti *Prevotella intermedia* yolk antibody (anti *P. intermedia*-IgY), and observe its preventive effect on rat experimental pregnancy gingivitis. **Methods** *P. intermedia* was cultured anaerobically, inactivated with 2% formaldehyde, with final concentration of 1×10^9 CFU/ml bacteria, 1 ml (0.5 ml liquid + 0.5 ml adjuvant) /times, 4 times the immune layer. Removed the egg white with yolk separator, sterile syringe punctured the vitelline membrane, collecting the yolk, two step ammonium sulfate precipitation and purification of anti *P. intermedia*-IgY. SDS-PAGE gel electrophoresis, Western blot and ELISA were used to detect molecular weight, specificity and changes in the immune titer of anti *P. intermedia*-IgY. 30 female SD rats, 15 male SD rats, female : male = 2 : 1 caged for 12 hours. 24 pregnant mice were randomly divided into 4 groups: 0.12% chlorhexidine incubation group, anti *P. intermedia*-IgY incubation group, physiological saline incubation group and blank control group, to observe the preventive effects of anti *P. intermedia*-IgY on experimental pregnancy gingivitis. **Results** After 4 immunization, the highest titer of antibody was 1 : 512 000, which was maintained at 45 d. 1 g yolk by two step ammonium sulfate precipitation was IgY about 18 mg. SDS-PAGE gel electrophoresis showed that the purity of purified IgY was 64.5%. Western blot showed anti *P. intermedia*-IgY recognition and specificity combined with *P. intermedia* bacterial cleavage fragment. Observation of 0.12% chlorhexidine incubation group and anti *P. intermedia*-IgY incubation group gingival index were significantly lower than that of the saline incubation group ($P < 0.01$), but there was no difference between the two gingival index. Gingival tissue pathology was observed to show that the inflammatory state of the anti *P. intermedia*-IgY group was less than that of the saline group. **Conclusion** After 4 times of immunization, sustaining high titer anti *P. intermedia*-IgY can be harvested, and anti *P. intermedia*-IgY can reduce the experimental pregnancy gingivitis inflammatory state of rats, which has a certain preventive effect on experimental pregnancy gingivitis of rats.

Key words *Prevotella intermedia*; egg yolk antibody; pregnancy gingivitis