

# 嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

豬血漿丙型球蛋白經蛋白酶作用後抗原結合性之研究

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：90-FH-12

執行期間：90年1月1日至90年12月31日

計畫主持人：杜艷櫻

共同主持人：陳昭誠

計畫參與人員：

執行單位：食品衛生系

中華民國 90 年 1 月 25 日

# 豬血漿丙型球蛋白經蛋白酶作用後抗原結合性之研究

90-FH-12

自民國 90 年 1 月 1 日起至民國 90 年 12 月 31 日

杜艷櫻  
食品衛生系

## 一、中文摘要

為了減少丙型球蛋白 (IgG) 的副作用，將 IgG 經蛋白酶 (papain、pepsin 或 trypsin) 水解去除 Fc 部分而僅保留 Fab 部分，可減少 immunogenic 效果，甚至可促使與抗體結合之毒素較快由腎臟排出。蛋白酶對 IgG 之作用，結果顯示殘存大活性隨作用時間增長和酵素/受質比增大而降低，其中經胃蛋白酶 (pH4.0)、胰蛋白酶及木瓜酶作用之水解物以 ELISA 法檢測仍具有抗原結合性，至於經胃蛋白酶 (pH2.0 及 pH3.0) 作用其 IgG 活性明顯降低，主要是因為 pH 值低導致變性。經自製免疫親和式層析法分離水解液中具抗原結合性之 Fab 顯示，經木瓜酶水解後對於抗 IgG-IgY 抗體免疫親和式膠體之吸附效果最好，其次為胰蛋白酶，吸附效果相當於木瓜酶之 0.89，而胃蛋白酶 (pH4.0) 吸附效果相當於木瓜酶之 0.78。Sephacryl S-300 HR 膠體過濾層析法分離 IgG 酵素水解物之層析圖。原來在約第 44 支收集管的高峰明顯下降，生成之水解物分佈在約第 61 支收集管的高峰中。由自製免疫親和式層析法先分離水解液中具抗原結合性之 Fab 再經 Sephacryl S-300 HR 膠體過濾層析，證明第 61 支收集管應為 Fab。

關鍵詞：豬血丙型球蛋白 ( $\gamma$ -globulin)、蛋白酶、anticomplementary、可結晶片段 (fragment crystallizable; Fc)、抗原結合片段 (fragment antigen binding; Fab)

## 二、緣由與目的

血液中含有有用成分如血清白蛋白、丙型球蛋白 ( $\gamma$ -globulin; IgG) 及凝血因子等，可以分離純化成高價值的各種血液製劑，以供更廣泛用途。臺灣每年豬隻屠宰數量相當可觀，豬血多且當作飼料或遭廢棄，不僅浪費資源而釀成環境污染。經臨床證明，豬的凝血因子 VIII 在注入患者體內後，可有效治療其症狀，且引起之抗體反應遠較注入人的凝血因子 VIII 濃縮品要來的低。此外，不會有感染 AIDS 或肝炎等病毒之可能，具有很高的利用價值。如何充分利用豬血資源，值得研究探討。IgG 由淋巴 B-細胞及其變形細胞與漿細胞 (plasma cell) 所生成，約佔血漿蛋白質的 12-19%，為一種醣蛋白，每一分子由一、二或五個單體

(monomer) 所構成，單體之分子量為 150,000，若分子為聚合體，則分子量可高達 1,000,000 左右。IgG 具有抗體及各種生物活性，包括通過胎盤、補體固定、皮膚固著與凝集作用等<sup>(4)</sup>，臨床上可應用於預防或治療疾病<sup>(5)</sup>。除大量使用時可能有蕁麻疹及局部過敏的情形之外，肌肉注射通常並無副作用出現<sup>(6)</sup>，因此其用法常不採用靜脈注射主要採肌肉注射方式。靜脈注射雖可產生大量抗體，然而若在製備 IgG 時因蛋白質變性或形成聚合物而使其產生原態 IgG 所沒有的生物活性及抗原性，如 reumatoid factor 的沉澱及 histamine 的釋放，則易造成心悸、呼吸困難，循環衰竭等嚴重反應<sup>(7)</sup>。不過，若為了急需大量抗體之病患，或為了減輕肌肉注射造成局部疼痛及組織傷害情形，則須以降解或修飾 IgG 的方法製備可供靜脈注射之產品<sup>(8)</sup>。將 IgG 以木瓜酶 (papain) 或胃蛋白酶 (pepsin) 降解，可得到可結晶片段 (fragment crystallizable; Fc) 以及抗原結合片段 (fragment antigen binding; Fab) 等小分子片段<sup>(8)</sup>。IgG 經去除 Fc 部分而僅保留 Fab 部分，可減少 immunogenic 效果，甚至可促使與抗體結合之毒素較快由腎臟排出。本實驗嘗試將 IgG 經不同蛋白酶水解去除 Fc 部分，並且以免疫親和式層析法純化 Fab 部分，再以 ELISA 法測定 IgG 經蛋白酶水解前後之抗原結合性變化。建立基礎資料供 IgG 純化及應用之參考。

## 三、結果與討論

### A. IgG 經酵素作用後活性之變化

1. 酵素/受質比例之影響  
胃蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜酶液以酵素/受質為 1/10, 1/50 和 1/100 比例方式與冷凍乾燥精製 IgG 粉末作用 1 hr，結果如圖一所示。在胃蛋白酶部份，pH 2 下未加胃蛋白酶時，IgG 活性殘存百分比已降為約 35%，隨著酵素/受質比增大而逐漸降低，明顯看出 pH 2 時，酸性之影響比胃蛋白酶大。另外在 pH 3 和 4 下，未加胃蛋白酶液時分別為約 82 和 97%，在酵素/受質比為 1/100 時，分別降為約 22% 和 79%，隨著酵素/受質比增大而逐漸降低，顯示一開始未與酵素作用時，由於 pH 值差異造成 IgG 活性殘存百分比不同，使得在較低 pH 值時 IgG 活性降低快速，再加上酵素/



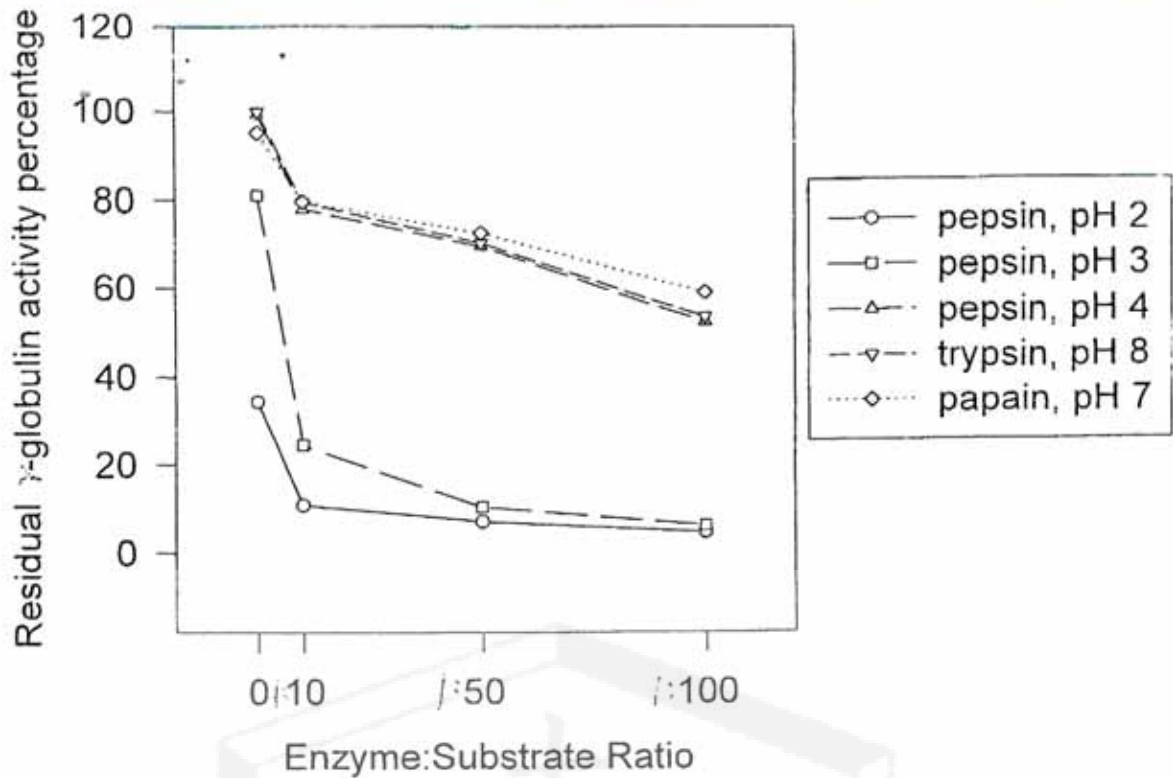
助益是不容忽視。

#### 四、成果自評

近年來由於學界對於食品成份及其生理機能性的了解日趨成熟，各種治療性食品的發展也日新月異。本研究以操作簡易且耐用性佳之免疫親和式膠體管柱層析法來獲得丙型球蛋白具抗原結合性之 Fab，可減少 immunogenic 效果。建立 IgY 親和式固定化分離模式，使其更具實用性。並可廣泛用於豬血漿中  $\gamma$ -globulin,  $\alpha$ -albumin 及多種有益蛋白質或酵素的回收以供藥用，甚至考慮此抗體之他種固定化模式，以配合業界大量生產之目的。

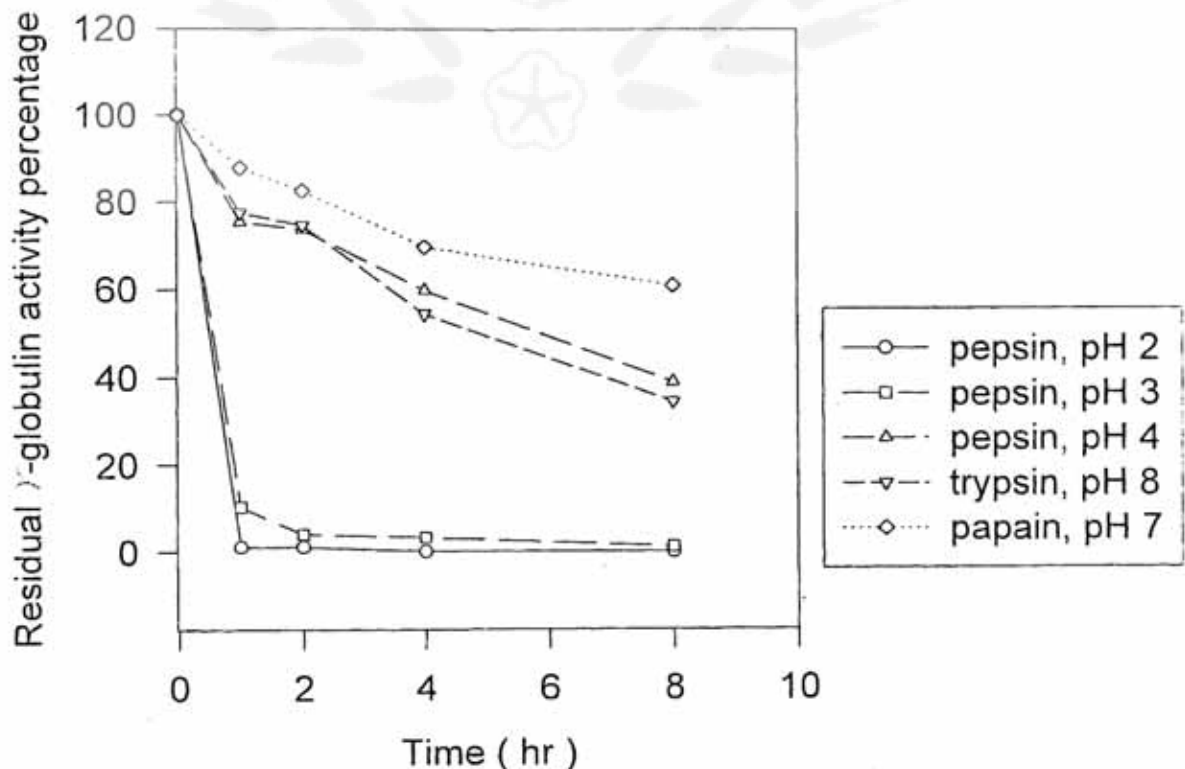
#### 五、參考文獻

- Gatti, L. and Mannucci, M. 1984. Use of porcine factor VIII in the of seventeen patients with factor VIII antibodies. *Thromb. Haemostas.* 51 (3) : 379.
- Hultin, M. B. and Hennessey, J. 1989. The use of poly electrolyte-fractionated porcin factor VIII in the treatment of a spontaneously acquired inhibitor to factor VIII. *Thromb. Res.* 55 : 51.
- Kessler, C. M. 1994. Porcine factor VIII in factor VIII antibody positive hemophiliacs. *J. Interf. res.* 14 : 175.
- 潘昭型, 1988, 免疫學, 新士林出版社 p.67。
- 馬仁和、俞仁妙, 1985。丙種球蛋白製品概述。藥學通報 20:743。
- Janeway, C. A. and Rosen, F. S. 1966. The gamma globulins. IV. Therapeutic uses of gamma globulin. *New Eng. J. Med.* 275 : 826-831.
- Ellis, E. F. and Henney, C. S. 1969. Adverse reactions following administration of human gamma globulin. *J. Allergy* 43 : 45-54.
- Johnstone, A. and Thorpe, R. 1987. *Immunochemistry in Practice.* Blackwell Scientific Publication. 2ed. Boston.
- Ismail, M., Shibl A, and Morad, A. 1983. Pharmacokinetics of  $I^{125}$  labeled antivenin to the venom from the scorpion. *Androctonus Amoreuxi.* *Toxicon* 21 : 47-56.
- Weir, D. M., Herzenberg, L. A., Blackwell, C. and Herzenberg, L. A. 1986 *Immunoabsorbents* 16.3. Ch. 16 in *Handbook of Experimental Immunology* vol. 1. *Immunochemistry.* 4th ed. Blackwell Sci. Co., New York.
- Hilpert, H., Brussow, H., Mietens, C., Sidoti, J., Lerner, L., and Werchau, H. 1987 Use of bovine milk concentrate containing antibody to rotavirus to treat rotavirus gastroenteritis in infants. *J. Infect. Dis.* 156:158.
- Al-Mashikhi, S. A. and Nakai, S. (1987) Isolation of bovine immunoglobulins and lactoferrin from whey protein by gel filtration techniques. *J. Dairy Sci.* 70:2486.
- van Eijk, H. G. and van Noort, W. L. 1976. Isolation of rat transferrin using CNBr-activated Sepharose 4B. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 14 : 475-478
- Buchta, R. 1991. Ovine lactoferrin : isolation from colostrum and characterization. *J. Dairy Research.* 58 : 211-218.
- Shimizu, M., Fitzsimmons, R. C. and Nakai, S. (1988) Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J. Food Sci.* 53: 1360.
- Hudson, L. and Hay, F. C. (1989) *Practical Immunology.* 3rd ed. Blackwell Scientific Co., London, UK.
- Musher, D. M., Johnson, B. and Watson, D. A. (1990) Quantitative relationship between anticapsular antibody measured by enzyme-linked immunosorbent assay or radioimmunoassay and protection of mice against challenge with *Streptococcus pneumoniae* serotype 4. *Infect. Immunol.* 58:3871.



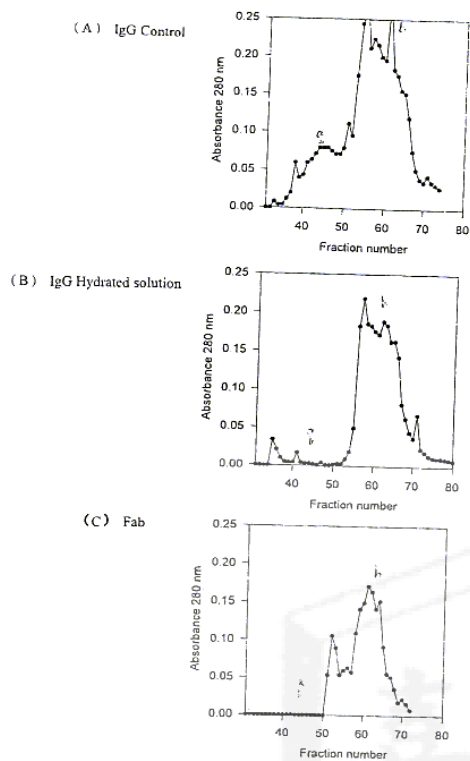
圖一 胃蛋白酶液、胰蛋白酶液和木瓜酶液在不同酵素/受質比下與IgG粉末作用1小時之IgG活性殘存百分比

Fig. 1. Residual IgG activity percentage of IgG powder treated with pepsin, trypsin and papain for 1 hr at different enzyme/substrate ratios.

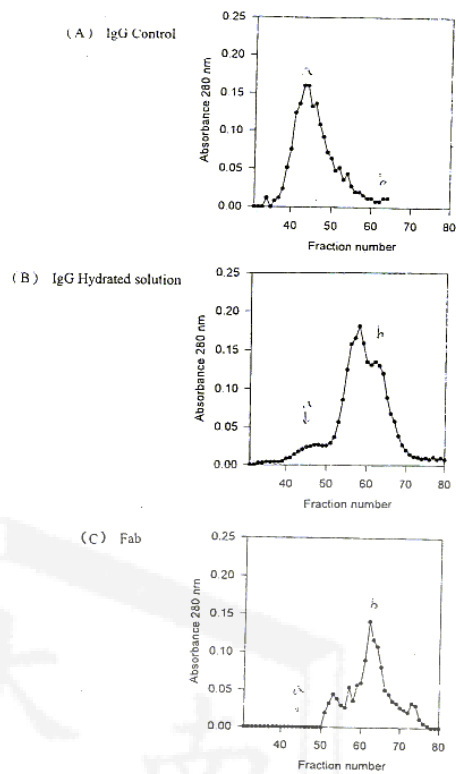


圖二 胃蛋白酶液、胰蛋白酶液和木瓜酶液在酵素/受質比 1/50 下與 IgG 粉末作用 0--8 小時之 IgG 活性殘存百分比

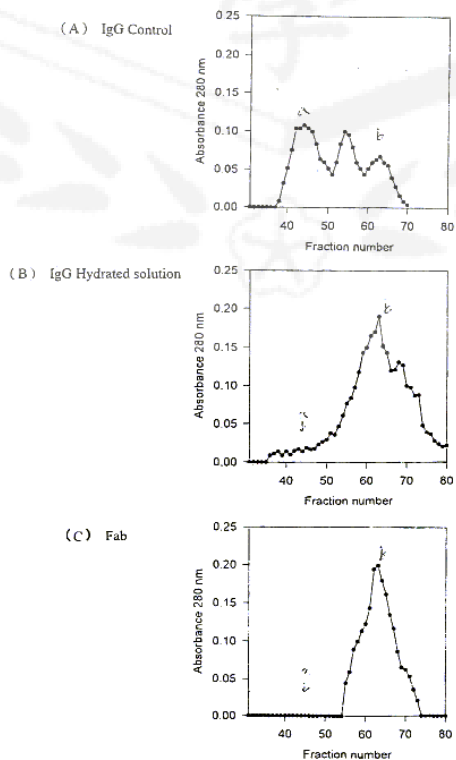
Fig. 2. Residual IgG activity percentage of IgG powder treated with pepsin, trypsin and papain for 0--8 hr at the enzyme/substrate ratio of 1/50.



圖三 IgG 液以胃蛋白酶液 ( pH 4.0 ) 水解後之 Sephacryl S-300 HR 膠體過濾層析圖  
Fig. 3. Elution patterns of separated IgG digested with pepsin ( E/S=1/10, pH 4.0 ) at 37°C 24 hrs on Sephacryl S-300 HR.



圖四 IgG 液以胰蛋白酶液 ( pH 8.0 ) 水解後之 Sephacryl S-300 HR 膠體過濾層析圖  
Fig. 4. Elution patterns of separated IgG digested with trypsin ( E/S=1/10, pH 8.0 ) at 37°C 24 hrs on Sephacryl S-300 HR.



圖五 IgG 液以木瓜酶液 ( pH 7.0 ) 水解後之 Sephacryl S-300 HR 膠體過濾層析圖  
Fig. 5. Elution patterns of separated IgG digested with papain ( E/S=1/10, pH 7.0 ) at 37°C for 24 hrs on Sephacryl S-300 HR.