

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

※ 雞蛋蛋黃中 IgY 在免疫親和式層析法中精製 ※

※ 豬血漿丙型球蛋白之應用 ※

※

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC - 89-2313-B-041-010

執行期間：88年 8月 1日至 89年 7月 31日

計畫主持人：陳 昭 誠

共同主持人：張 鴻 民

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：嘉南藥理學院食品衛生系
(現改為：嘉南藥理科技大學)

中華民國 89 年 9 月 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告
雞蛋蛋黃中 IgY 在免疫親和式層析法中精製豬血漿丙型球蛋白之
應用

Application of Hen Egg Yolk IgY to Separate Pig Blood γ -globulin
by the Immunoaffinity Chromatography Method

計畫編號: NSC 89-2313-B-041-010

執行期限: 自民國 88 年 8 月 1 日起至民國 89 年 7 月 31 日

主持人: 陳昭誠 執行機構及單位: 嘉南藥理學院食品衛生系

共同主持人: 張鴻民 執行機構及單位: 臺灣大學食品科技研究所

計畫參與人員: 杜艷櫻 執行機構及單位: 臺灣大學食品科技研究所

一、中文摘要

雞蛋黃中抗體 (immunoglobulin yolk, IgY) 含量高 (10mg/ml yolk), 且收集雞蛋容易, 為抗體之最佳潛力來源。本研究旨在將傳統免疫親和式層析法上所用之專一性抗體 IgG (immunoglobulin G) 改為 IgY, 並探討其效果差異及可行性。免疫親和式層析 (immunoaffinity chromatography) 是純化蛋白質最佳方法之一, 主要利用抗原與抗體之專一性吸附作用而達到純化結果。此法具操作簡易, 且耐用性佳之特色。本研究將應用此方法純化具特異性之 IgY。再以所得具特異性之 IgY 應用於丙型球蛋白之純化: 傳統純化丙型球蛋白的方法多未盡理想, 如以沉澱法製備之產品其純度和回收率均不高, 而一般層析法不易擴大規模及連續化生產。臺灣每年豬隻屠宰數量相當可觀, 豬血多數當作飼料或遭廢棄, 不僅浪費資源而且造成環境污染, 因此如何充分利用豬血資源值得研究探討。

以免疫親和式層析法分離純化抗丙型球蛋白抗體 IgY 之相對比活性為 627。ELISA 法測定丙型球蛋白抗原-抗丙型球蛋白抗體 IgY 之 Kd 值約 1.5

$\times 10^{-8} M$, Ka 值約 $0.94 \times 10^8 M^{-1}$ 。來亨雞抗血清與白兔抗血清 IgG 之 Ka 值相近。豬血漿中丙型球蛋白樣品 (濃度約為 5 mg/ml) 經 IgY 之免疫親和式層析法純化後相對比活性為 15.25 倍。回收率為 81.15%。最大吸附量與解離常數 Qmax 約 0.2 mg/ml wet gel, Kd 值約等於 $5 \times 10^{-6} M$, 可知親和性吸附作用力很強。

關鍵詞: IgY、丙型球蛋白、免疫親和式層析、豬血漿

二、英文摘要

The high immunoglobulin content (approximate 10 mg/ml) in the egg yolk (IgY), the ease of egg collection, as well as the large quantities of chicken eggs available make IgY an potential source for immunological supplementation of foods. The major purposes of the present study were to elucidate the possibility of replacing the immunoglobulin G (IgG) bound to immunoaffinity gel by IgY, and the difference between kinds of affinity chromatographies. Immunoaffinity chromatography, exhibits some advantages over other methods such as

the ease of operation and scaling up, has been considered as one of the efficient methods in purification proteins. In addition to be added to the infant formulates to meet the quantitative requirement, r-globulin exhibits various bio-activities and is useful in preventing and treating diseases in clinic. Therefore, investigations on recovering r-globulin from pig blood appear worthwhile.

The relative specific activity of anti- γ -globulin-antibody IgY purified by immunoaffinity chromatography was calculated to be 627. The K_d and K_a between γ -globulin and anti- γ -globulin-antibody IgY was about 1.5×10^{-8} M and 0.94×10^8 M⁻¹. But the K_a value showed similar to the trends of hen and rabbit antiserum. The relative specific activity of γ -globulin concentration in pig blood (about 5 mg/ml) purified by IgY (specific against γ -globulin)-immunoaffinity column was 15.25 with a recovery of 81.15%. The Q_{max} and K_d of targeted protein to such affinity gel was determined to be 0.2 mg/ml wet gel and 5×10^{-6} M, respectively, revealing a strong absorption of γ -globulin to affinity gel.

Keywords : IgY, r-Globulin,
Immunoaffinity Chromatography,
Pig Blood

三、緣由與目的

丙型球蛋白具有抗體及各種生物活性，臨床上可應用於預防或治療疾病，其用法主要採肌肉注射方式。靜脈注射雖可產生大量抗體，然而若在製備丙型球蛋白時因蛋白質變性或形成聚合物而使其產生原態丙型球蛋白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，因此通常不採用靜脈注射。除非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(馬和俞，1985)。

傳統分離純化丙型球蛋白的方法多未盡理想，如使用沉澱法時純度和回收率並不高 (Bjorling, 1972; Steinbuch, 1980)；而一般層析法不易擴大規模及連續化生產。臺灣每年豬隻屠宰數量相當可觀，豬血多數當作飼料或遭廢棄，不僅浪費資源而且造成環境污染，如何充分利用豬血資源，值得研究探討。本實驗將嘗試以操作簡便且易於量化生產之免疫親和式層析法來純化豬血丙型球蛋白，期望建立能得到高純度和高回收率又可量化生產丙型球蛋白的方法。

血液由血球和血漿所組成。血球可再分為紅血球、白血球與血小板。血漿又分為血清白蛋白、血清球蛋白與纖維蛋白原。血清球蛋白作電泳分析時，以其泳動速率快慢可分為 α - (甲型)、 β - (乙型)， γ (丙型) 三種球蛋白。丙型球蛋白由 4 個鏈 (2 個重鏈，2 個輕鏈) 組成，可與外來抗原結合 (Bottomley et al., 1990)，具重要的免疫功能；又稱為免疫球蛋白 (immunoglobulins)。而依免疫化學性質之差異可再分為 IgG、IgM、IgA、IgD 及 IgE 五種。當免疫球蛋白缺少或不足時，免疫系統對抗抗原的能力便有所不足，醫療用之丙型球蛋白製劑則有助於改善此情形。純化後之丙型球蛋白在臨床上可用於：(1) 預防病毒性疾病，如肝炎、麻疹，水痘等。(2) 與抗生素合併使用，治療細菌或病毒引起之嚴重感染。(3) 先天性或後天性免疫功能不全患者之治療 (馬和俞，1985)。

2. 丙型球蛋白的分離純化方法

由血漿中分離丙型球蛋白的方法主要有沉澱法及層析法

(1) 沉澱法

丙型球蛋白的分離方法須先以冷凍沉澱法初步分離分子量較大之凝血因子及纖維蛋白原。冷凍方式可用液態氮、乙醇/乾冰浴及直接在冷凍庫降溫等方式。沉澱物含量會受冷凍溫度不同而影響 (Rock and Tittley, 1979; De et al., 1989; Slichter et al., 1976)。

(2) 層析法

(a) 利用丙型球蛋白的等電點大於其他蛋白質，可以採用離子交換層析法來分離之 (Hjerten and Zelikman, 1988)；

(b) 利用只有丙型球蛋白跟鹽基式磷灰石 (hydroxyapatite) 結合會受氯離子影響，可以採用高效液相層析 (HPLC) 法 (Hjerten et al., 1988)；

(c) 利用蛋白質 A 或蛋白質 B 與丙型球蛋白有專一性吸附，可以採用親和性層析法 (Forsgren and Sjoquist, 1967)；

(d) 另外還可以利用抗原或抗免疫球蛋白之抗體與丙型球蛋白有專一性結合之免疫親和性層析法，獲得高純度丙型球蛋白 (Anderson et al., 1970; Cripps et al., 1983)。

(3) 逆微胞萃取法

控制磷酸緩衝溶液的 pH 值，氯化鈉與界面活性劑 (AOT)，可得到純度及回收率都很高的丙型球蛋白 (楊, 1997)。

(4) 免疫親和式層析法

操作簡便且易於量化生產，是純化蛋白質最佳方法之一。傳統分離純化乳丙型球蛋白 (γ -Globulin) 的方法多未盡理想，因此嘗試以 IgY 免疫親和式層析法來純化此種機能性蛋白質。丙型球蛋白為血液中之抗體具各種生物活性，臨床上可應用於預防或治療疾病。常遭廢棄之豬血可以分離

純化成高價值的丙型球蛋白，但如何充分利用資源並避免環境污染，值得研究探討。

四、結果與討論

白兔及來亨雞第一次免疫後之抗血清及蛋黃液直到稀釋倍數為 10^3 抗丙型球蛋白抗體之活性才明顯減低。隨著免疫日數的增加，白兔及來亨雞血清及蛋黃液中抗丙型球蛋白抗體之活性經 $5,120(10 \times 8^3)$ 倍稀釋之 ELISA 值，持續上升至 0.34 ± 0.01 , 0.63 ± 0.01 , 0.53 ± 0.03 才開始下降。而 titer 值在第四次免疫時都可達到最高值，丙型球蛋白對來亨雞比對白兔可誘發較高的抗體產生。另外亦測定市售白兔抗丙型球蛋白抗血清之活性 (0.34 ± 0.007) 和 titer 值 (3.28×10^5)，結果與本實驗最高點之值相當接近。

以自製免疫親和式層析法分離純化抗丙型球蛋白抗體，可得抗丙型球蛋白抗體比活性為 22.46/mg protein，相對於原蛋黃液之相對比活性為 627.37。丙型球蛋白 ELISA 測定濃度範圍約在 50-500 ng/ml 具良好線性關係，靈敏度約 50 ng/ml。丙型球蛋白樣品 (濃度約為 5 mg/ml) 經來亨雞蛋黃液純化抗丙型球蛋白抗體 IgY 之免疫親和式層析法純化後，使丙型球蛋白由原來豬血漿中之比活性 0.12/mg protein 提升至 1.83/mg protein，相對比活性為 15.25 倍，回收率為 81.15%。由 IgY-免疫親和式膠體的最大吸附量 (Q_{max}) 與解離常數 (K_d) 可知市售純丙型球蛋白與豬血漿中丙型球蛋白吸附之 Q_{max} 與 K_d 值極接近，其 Q_{max} 約 0.2 mg/ml wet gel, K_d 值約等於 $5 \times 10^{-6} M$ ，可知親和性吸附作用力很強。以競爭性 ELISA 法測定抗原-抗體 IgY 之 K_d 值約 $1.5 \times 10^{-8} M$, K_a 值約 $0.94 \times 10^8 M^{-1}$ 。又將抗體改以來亨雞及白兔抗血清或粗 IgY 液等不同稀釋液取代，可推算出類似

的Ka值。來亨雞抗血清與白兔抗血清IgG之Ka值相近。純化之抗丙型球蛋白IgY與丙型球蛋白經SDS-PAGE梯度電泳及免疫轉印法結果主要色帶，在分子量66.4 kD上下有一較深且厚的色帶，為抗丙型球蛋白IgY的重鏈，在分子量55.6 kD以上有一較深且厚的色帶，主要為丙型球蛋白重鏈，此外無其他色帶，顯示其純度極高。

五、成果自評

免疫親和式層析法可使丙型球蛋白由原來豬血漿中之比活性0.12/mg protein 提升至1.83/mg protein，相對比活性為15.25倍。回收率為59.44%。市售丙型球蛋白再經免疫親和式層析法純化後之比活性仍接近1，表示原來純度極佳故幾乎無變化。由IgY-免疫親和式膠體的最大吸附量(Qmax)與解離常數(Kd)可知市售純丙型球蛋白與豬血漿中丙型球蛋白吸附之Qmax與Kd值極接近，甚至於抗丙型球蛋白抗體也類似。

本實驗研究工作內容與目標與原計畫完全相符，整體而言達成預期目標95%以上，研究成果亦相當可觀，現在有三篇正著手投稿國外著名SCI食品相關學術期刊，預定近期即可刊載。本實驗研究工作提供參與研究人員學習免疫處理之訓練，及免疫分析之經驗，所得之成果可供業界參考，並可將免疫球蛋白導入藥品業與食品業，更加速免疫機能性藥品與食品在臺灣之研發！

六、參考文獻

- 1.馬仁和、俞仁妙，1985。丙種球蛋白製品概述。藥學通報 20:743。
- 2.Rock, G. A. and Tittley, P. 1979.The effect of temperature variations on

cryoprecipitate. *Trasfusion*. 19 (1) : 86-89.

- 3.De, M., Banerjee, D., Chandra, S. and Bhattacharya, D. K. 1989. A simple method for preparation of good quality cryoprecipitate. *Indian. J. Med. Res.* 90 : 32-35.
- 4.Slichter, S. J., Henderson, C. R. and Harker, L. A. 1976.Preparation of cryoprecipitated factor VIII concentrates. *Transfusion* 16 (6) : 616-626.
- 5.Bjorling, H. 1972. I. Plasma fractionation methods used in Sweden. *Vox Sang.* 23 : 18-23.
- 6.Steinbuch, M. 1980. Protein fractionation by ammonium sulfate, rivanol and caproic acid precipitation. In: *Methods of Plasma Protein Fractionation*. Curling, J., ed. p. 33. Academic Press, London.
- 7.Hjertrn S. and Ilya, Z. 1988. Chromatographic purification of γ -globulin from human serum on ferric oxide-agarose columns. *J. Biochem. Biophys. Methods* 17: 67-73.
- 8.Forsgren, A. and Sjoquist, J. 1967. "Protein A" from *Staphylococcus aureus* III. Reaction with rabbit γ -globulin. *J. Immunol.* 99 : 19-24.
- 9.Anderson, T. O., Zschocke, R. H. and Bach, G. L. 1970. Studies on IgA .II .Isolation of IgA from small volumes of human serum by immunoabsorption. *J. Immunol.* 105 : 146-153.
- 10.Cripps, A. W., Neoh, S. H. and Smart, I. J. 1983. Isolation of human IgA and IgM from normal serum using polyethylene glycol precipitation and affinity chromatography. *J.Immunol. Methods* 57 : 197-203.

附加圖表

表 1 不同稀釋倍數之來亨雞抗血清與結合體間之 ELISA 值變化
Table 1. Changes in ELISA value of different dilution folds of hen antiserum and conjugate concentration

Dilution fold of hen antiserum ($\times 10^4$)	ELISA value ($A_{490\text{nm}}$)					
	Dilution fold of conjugate					
	1000	2000	4000	8000	16000	32000
0.1	0.87 \pm 0.01	0.87 \pm 0.00	0.82 \pm 0.00	0.73 \pm 0.00	0.53 \pm 0.01	0.30 \pm 0.00
0.2	0.88 \pm 0.00	0.86 \pm 0.01	0.82 \pm 0.00	0.74 \pm 0.00	0.57 \pm 0.00	0.33 \pm 0.00
0.4	0.85 \pm 0.00	0.81 \pm 0.01	0.78 \pm 0.00	0.67 \pm 0.01	0.53 \pm 0.01	0.32 \pm 0.00
0.8	0.82 \pm 0.00	0.77 \pm 0.01	0.70 \pm 0.01	0.65 \pm 0.04	0.44 \pm 0.00	0.28 \pm 0.00
1.6	0.81 \pm 0.00	0.78 \pm 0.01	0.62 \pm 0.01	0.50 \pm 0.03	0.38 \pm 0.03	0.24 \pm 0.01
3.2	0.75 \pm 0.00	0.64 \pm 0.00	0.52 \pm 0.01	0.39 \pm 0.01	0.30 \pm 0.02	0.18 \pm 0.00
6.4	0.75 \pm 0.00	0.59 \pm 0.00	0.46 \pm 0.01	0.32 \pm 0.01	0.22 \pm 0.00	0.15 \pm 0.00
12.8	0.74 \pm 0.01	0.58 \pm 0.01	0.41 \pm 0.02	0.28 \pm 0.01	0.18 \pm 0.00	0.13 \pm 0.01

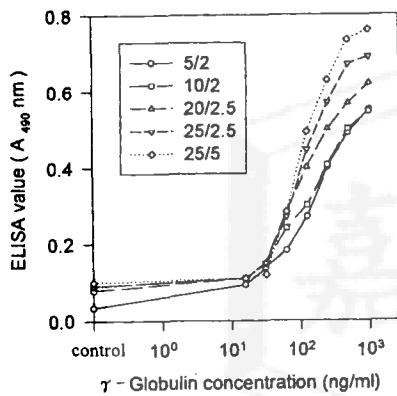


圖 1 來亨雞之抗丙型球蛋白抗體 IgY / 結合體 ($\mu\text{g/ml}$) 對不同濃度丙型球蛋白之 ELISA 值

Fig. 1 ELISA absorbance values obtained with a range of γ -globulin concentration in combinations with various ratios of anti γ -globulin antibody IgY / antibody-peroxidase conjugate ($\mu\text{g/ml}$).

表 2 管柱層析法之 γ -globulin 對於抗丙型球蛋白抗體 IgY-免疫親和式膠體吸附的最大吸附量 (Q_{max}) 與解離常數 (K_d)

Table 2. Binding parameters of anti- γ -globulin IgY-immunoaffinity chromatography for γ -globulin

	Parameters	
	Q_{max}^*	K_d ($\times 10^{-4}$)**
Commercial γ -globulin	0.203	6.26
Pig plasma γ -globulin	0.268	4.23

*binding capacity (mg / per ml wet gel)

**dissociation constant (M)

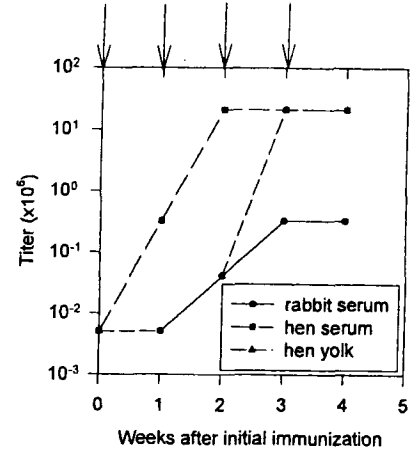


圖 2 免疫期間來亨雞及白兔抗血清及蛋黃液中抗丙型球蛋白對丙型球蛋白抗原之抗體力價

Fig. 2 Titers of hen and rabbit antiserum and hen yolk against γ -globulin. Serums and yolks were obtained from hens immunized intramuscularly and rabbit immunized subcutaneously with γ -globulin. Arrows indicate the immunization schedule. Immunization was performed every week for four weeks after initial immunization.

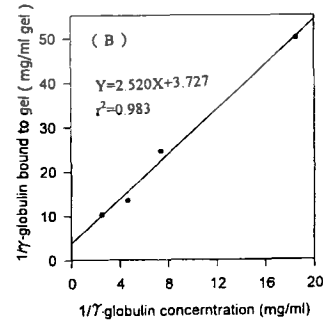
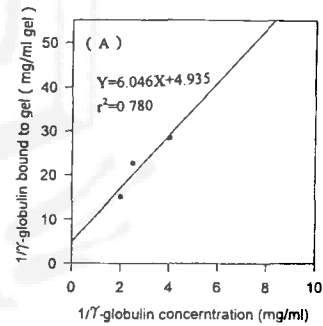


圖 3 抗丙型球蛋白抗體 IgY-免疫親和式膠體對於丙型球蛋白之 Lineweaver Burk 直線

Fig. 3. Lineweaver Burk line of γ -globulin by IgY-immunoaffinity chromatography. (A) commercial γ -globulin and (B) pig plasma γ -globulin.