

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

自製抗乳鐵蛋白抗體 IgY 免疫親和式膠體特異性之探討
Studies on Specific of Laboratory Prepared Anti-Lactoferrin IgY Immunoaffinity
Chromatography Gel

計畫編號: NSC 90-2313-B-041-013

執行期限: 自民國 90 年 8 月 1 日起至民國 91 年 7 月 31 日

主持人: 杜艷櫻 執行機構及單位: 嘉南藥理科技大學食品衛生系

一、中文摘要

比較自製抗牛初乳乳鐵蛋白抗體 IgG 及 IgY 對於其他相似鐵蛋白如牛常乳、羊乳、人乳、蛋黃中 ovoferrin、及牛與人血漿中 transferrin 等之親和特異性差異，經 ELISA 測試結果發現除了牛常乳與羊乳外其他相似鐵蛋白幾乎無法與牛初乳抗乳鐵蛋白抗體 IgG 及 IgY 有特異性反應。再以自製抗體 IgG 及 IgY 免疫親和式膠體純化牛初乳、常乳與羊乳之乳鐵蛋白，在免疫親和式層析管柱中含乳鐵蛋白濃度約 0.2 mg/ml 之樣品以 IgY 免疫親和式層析法純化後，市售純牛初乳、市售純常乳與羊乳之比活性各為 $(121、98 和 70) \times 10^{-3}$ ，純化倍數各為 $(121、98 和 800) \times 10^{-3}$ ，經 IgG 免疫親和式層析法純化後比活性各為 $(178、95 和 175) \times 10^{-3}$ ，純化倍數各為 $(178、95 和 2000) \times 10^{-3}$ 。由吸附圖中推算 IgG 及 IgY-免疫親和式膠體的最大吸附量 (Q_{max}) 與解離常數 (K_d)，免疫親和式膠體 IgY 對市售純牛初乳、市售純常乳與羊乳的最大吸附量各為 0.012、0.010 和 0.002 mg/ml wet gel，與 IgG 各為 0.017、0.010 和 0.002 mg/ml wet gel 相近。至於親和性吸附作用力亦相近，IgY 解離常數 K_d 值 IgY 各為 4.00×10^{-6} 、 4.00×10^{-6} 和 $3.78 \times 10^{-5} M$ ，IgG 各為 2.60×10^{-6} 、 0.6×10^{-6} 和 $3.15 \times 10^{-5} M$ 。

關鍵詞：乳鐵蛋白、鐵蛋白、IgY、
免疫親和性膠體、特異性。

英文摘要

The anti-bovine colostrum LF antibody IgG or IgY were be detected the specific

affinity of LF from bovine colostrum, bovine normal, goat normal milk, and ferrin from yolk ovoferrin and serum transferrin by ELISA. There had no specific affinity for anti-bovine colostrum LF antibody IgG or IgY against ferrin beside LF from bovine colostrum, bovine normal, goat normal milk. The purified anti-bovine colostrum LF antibody IgG or IgY were be immobilized on the Sepharose gel to purify LF from bovine colostrum, bovine normal, goat normal milk. The purification specific activity of commercial bovine colostrum, commercial bovine normal, goat normal milk (about 0.2 mg/ml) purified by IgY-and IgG- (specific against LF) -immunoaffinity column was observed to be $(121、98 和 70) \times 10^{-3}$; $(178、95 和 175) \times 10^{-3}$ and purification fold was $(121、98 和 800) \times 10^{-3}$; $(178、95 和 2000) \times 10^{-3}$, respectively. Based on the above results, both two kinds of affinity columns almost exhibit same purification effect and similar Q_{max} (0.002-0.017 mg/ml wet gel) and K_d ($0.315-4 \times 10^{-6} M$).

二、緣由與目的

目前的嬰兒配方奶粉強調母乳化，人乳中乳鐵蛋白 (lactoferrin, LF) 含量 2-4g/L，牛乳中含 0.02-0.35g/L，相差近百倍之多，實在須要加以調整。在臺灣，牛初乳常為廢棄物，主要因為牛初乳中球蛋白容易因加熱而凝固，因此乳品製造業不以初乳為原料乳，但是牛初乳中含乳鐵蛋白高達 600mg/ml，而牛正常乳中僅含乳鐵蛋白 10mg/ml，二者顯著差約六十倍之多

(1)。若能將牛初乳中乳鐵蛋白分離純化出來，添加在配嬰兒方奶粉，將可同時解決嬰兒配方奶粉母乳化及資源回收等問題。目前市面上流行之高鐵高鈣配方乳粉，其中所添加之鐵多為無機鐵，除了人體吸收不盡理想外，理論上易造成乳粉之脂質氧化，產生自由基及過氧化物，攝入體內後若與過氧化氫共存，則可能引起Fenton Reaction 或 iron-catalyzed Haber-Weiss reaction 及 lipid peroxidation 等而激發更多的自由基產生，對人體健康造成威脅(2)。若能以乳鐵蛋白取代無機鐵，不論人體內吸收率或安全性都會顯著改善，並且可使配方乳粉朝向更適合人體食用之健康食品的境界。

乳鐵蛋白的主要生理特性如下：

一、靜菌作用：Bullen等⁽³⁾首先提到乳鐵蛋白抑菌作用，可抑制G(-)菌生長，因乳鐵蛋白會與其競爭鐵而抑制G(-)菌生長。Saito等⁽⁴⁾指出在pH 2下加熱至120°C、15min後可生成水解率約10%之乳鐵蛋白胍，此胍具有殺菌的作用且此作用和鐵離子的存在與否無關。這類強力的抗菌胍 (antibacterial peptides) 也可以經由胃蛋白酶和其他的酸性蛋白酶水解生成，而這些低分子量的胍其抑菌活性比乳鐵蛋白高出8倍之多且在鐵離子存在下依然保持高抑菌力。乳鐵蛋白本身即具有廣效的抗菌作用。Tomita等⁽⁵⁾發現以胃蛋白酶水解此蛋白所得之胍，其抗菌效果遠較乳鐵蛋白高，因此推測乳鐵蛋白應只是具有先質的功能，所以極有潛力開發成為食品之天然抗菌物質。

二、調節免疫機能：具有活化白血球的免疫作用，且有阻礙補體c2附著紅血球的作用⁽¹⁾。

三、其他機能：尚有促進細胞增殖、抑制過氧化脂質形成，抑制組織胺游離及抗發炎等功能。這些功能主要是由於乳鐵蛋白能迅速鍵結游離的鐵離子，因而防止游離的鐵離子促進脂質過氧化所造成的傷害⁽¹⁾。

目前常用分離乳鐵蛋白之方法可歸納分為三大類：第一類是膜過濾法⁽⁶⁾；第二

類是管柱層析法，包括膠體過濾及離子交換樹脂法⁽⁷⁻⁹⁾；第三類是上述方法之結合或修飾法^(10,11)。以膜過濾法不易獲得高純度乳鐵蛋白，以管柱層析法可得較佳之產品，尤其以抗體—抗原交互作用之免疫親和式膠體管柱層析法 (immunoaffinity chromatography) 來純化乳鐵蛋白可得極高純度之產品。又免疫親和式膠體管柱層析法之膠體製備雖較傳統煩雜，但操作簡易且耐用性佳為其最大優點。

分離精製動物血清中之抗體以進行親和式膠體管柱層析法雖已被學者廣泛採用，但由於將動物免疫處理後抽出血清再精製成免疫球蛋白的製程不僅複雜且血清產量有限，故轉由雞蛋黃中製備 immunoglobulin yolk (IgY) 有下列優點：(1) 雞蛋收集不似採血需專門技術；(2) 雞蛋蛋黃中只有一種抗體(IgY)存在；(3) 大規模飼養上，雞較兔子、豬、牛等哺乳動物容易，花費較低；(4) 由屬於食品之雞蛋取得抗體較由血液取得衛生；(5) 雞蛋中IgY含量較哺乳類血清或乳汁中抗體含量高；(6) 雞蛋產量大，且有逐年增加趨勢，故極具發展潛力^(12,13)。八田等⁽¹⁴⁾亦指出平均一隻產卵雞每年所產下的蛋，其卵黃所含IgY含量約為40 g，此相當30隻兔子血清IgG之總和。

本人⁽¹⁵⁾博士論文利用IgY分離牛初乳中乳鐵蛋白之研究，發現IgY與IgG在分離牛乳初乳中之乳鐵蛋白有類似的結果，因此在免疫親和式膠體層析法之應用時以IgY取代IgG的確可行。在實驗技術上和研究經驗上，也有相當豐富的研究心得與熟練的研究技術。本研究期望將白兔及來亨雞隻免疫處理後，抽取其血清及雞蛋黃中粗抗體，接著以LF-sepharose純化抗LF抗體(即去除非抗LF之抗體)。再以純化抗LF抗體製成anti-bovine LF免疫親和式膠體，最後分離牛初乳以外來源之LF如牛常乳、羊乳、與其他相似之鐵蛋白如蛋黃中 ovoferrin、血漿中 transferrin 等，比較 anti-bovine LF免疫親和式膠體管柱層析法對於其他相似鐵蛋白之親和性之差異，

IgY在此方面之研究利用尚未開發值得進一步探討。

三、結果與討論

本研究以免疫學上專一性強的抗原—抗體反應原理，進行免疫親和式膠體純化。首先比較自製抗牛初乳乳鐵蛋白抗體 IgG 及 IgY 對於其他相似鐵蛋白如牛常乳、羊乳、人乳、蛋黃中 ovoferrin、及牛與人血漿中 transferrin 等之親和特異性差異，經 ELISA 測試結果發現除了牛常乳與羊乳外其他相似鐵蛋白幾乎無法與牛初乳抗乳鐵蛋白抗體 IgG 及 IgY 有特異性反應（表一及表二）。再以自製抗體 IgG 及 IgY 免疫親和式膠體純化牛初乳、常乳與羊乳之乳鐵蛋白，在免疫親和式層析管柱中含乳鐵蛋白濃度約 0.2 mg/ml 之樣品以 IgY 免疫親和式層析法純化後，市售純牛初乳、市售純常乳與羊乳之比活性各為 $(121、98 和 70) \times 10^{-3}$ ，純化倍數各為 $(121、98 和 800) \times 10^{-3}$ ，經 IgG 免疫親和式層析法純化後比活性各為 $(178、95 和 175) \times 10^{-3}$ ，純化倍數各為 $(178、95 和 2000) \times 10^{-3}$ 。圖 1 與圖 2 分別為乳鐵蛋白與抗乳鐵蛋白抗體 (IgG 及 IgY)-免疫親和式膠體的等溫吸附曲線，此曲線符合 Langmuir isotherm。另外以 Lineweaver Burk 繪圖，分別得圖 3 與圖 4。由圖中推算 IgG 及 IgY-免疫親和式膠體的最大吸附量 (Q_{max}) 與解離常數 (K_d) (表四)，免疫親和式膠體 IgY 對市售純牛初乳、市售純常乳與羊乳的最大吸附量各為 0.012、0.010 和 0.002 mg/ml wet gel，與 IgG 各為 0.017、0.010 和 0.002 mg/ml wet gel 相近。至於親和性吸附作用力亦相近，IgY 解離常數 K_d 值 IgY 各為 4.00×10^{-6} 、 4.00×10^{-6} 和 $3.78 \times 10^{-5} M$ ，IgG 各為 2.60×10^{-6} 、 0.6×10^{-6} 和 $3.15 \times 10^{-5} M$ 。因此在免疫親和式層析法純化牛初乳中乳鐵蛋白之應用時以 IgY 取代 IgG 的確可行。

四、成果自評

由於臺灣加入 WTO 後，開放的自由經濟市場，進口的乳品對於國內酪農業的

打擊相當大，因此酪農業與乳品業必須要升級，以生物科技結合新進食品科技改進乳品品質，開發新產品，以期提高附加價格，其中牛乳中具有生理活性成分的分離與應用頗符合此項要求，並可提供具有機能性之乳品，對國人營養與健康是一大福音！

本研究以操作簡易且耐用性佳之免疫親和式層析法來獲得高純度之 LF。期望以雞蛋黃中唯一抗體 IgY 製備的諸多優點，克服傳統免疫處理動物之抽血不易及血清產量有限等問題，甚至能取代傳統血清法，以利建立 IgY 親和式固定化分離模式，使其更具時實用性。並可廣泛用於多種有經濟價值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

1. Kussendrager, K. 1996. Lactoferrin and lactoperoxidase bio-active milk proteins. Food Tech. Europe. 2(4):39-43.
2. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. 1989. Free radical in biology and medicine. 2nd ed. Oxford University Press, New York.
3. Bullen, J.J., Rogers, H.J. and Leigh, L. 1972. Iron-binding proteins in milk and resistance to *E. coli* infection in infants. Br. Med. J. 1:69.
4. Saito, H., Miyakawa, H., Tamura, Y., Shimamura, S., and Tomita, Y. 1991. Potent bactericidal activity of bovine lactoferrin hydrolysate produce by heat treatment at acidic pH. J. Dairy. Sci. 74: 3724 - 3730.
5. Tomita, M., Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H. and Kawase, K. 1992. Potent antibacterial peptides generated by pepsin digestion of bovine lactoferrin. J. Dairy Sci. 74:4137 - 4142.
6. Maynard, F., Pierre, A. and Maubois, J. L. 1989. Fractionation of human lactoferrin and α -lactalbumin using microfiltration and ultrafiltration membranes. Le Lait 69: 59-65.

7. Groves, M. L. 1965. Preparation of some iron-binding proteins and α -lactalbumin from bovine milk. *Biochim. Biophys. Acta* 100 : 154.
8. 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 : 2486-2492.
9. Foley, A. A. and Bates, G. W. 1987. The purification of lactoferrin from human whey by batch extraction. *Anal. Biochem.* 162 : 296-300.
10. Chen, J. P. and Wang, C. H. 1991. Microfiltration affinity purification of lactoferrin and immunoglobulin G from cheese whey. *J. Food Sci.* 56 : 701-706, 713.
11. Kawakami, H., Shinmoto, H., Dosaka, S., and Sogo, Y. 1987. One-step isolation of lactoferrin using immobilized monoclonal antibodies. *J. Dairy Sci.* 70 : 752-759.
12. Otake, S., Nishihara, Y., Makimura, M., Hatta, H., Kim, M., Yamamoto, T. and Hirasawa, M. 1991. Protection of rats against dental caries by passive immunization with hen-egg-yolk antibody (IgY). *J. Dent. Res.* 70 : 162-166.
13. 臺灣農業年報. 1994. 臺灣省政府農林廳.
14. 八田一, 長戶有希子, 金武祚, 1993. 雞卵抗體(IgY)精製方法. *農化* 67 : 1422-1425.
15. 杜艷櫻. 2000. 以雞蛋黃免疫球蛋白-免疫親和式層析法對牛乳乳鐵蛋白及豬血丙型球蛋白之純化. 博士論文. 臺灣大學食品科技研究所. 臺北市. 臺灣.

附加圖表

表二、雞卵抗牛乳乳鐵蛋白抗體 IgY 對牛乳、牛常乳、牛常乳及人常乳乳鐵蛋白、乳清鐵蛋白、牛與人血漿中運鐵蛋白等抗原之 ELISA 親和特異性差異
Table 2 The difference of affinity specific of anti-bovine colostral lactoferrin IgY against bovine colostral, bovine normal, goat normal and human normal lactoferrin, ovoferrin, bovine and human transferrin
Affinity specific of anti-bovine colostral lactoferrin IgY was determined by ELISA method

Concentration (ng/ml)	0.01	15.63	31.25	62.50	125.00	250.00	500.00	1000.00
Bovine colostral lactoferrin	0.37 ±0.02	0.45 ±0.01	0.44 ±0.02	0.47 ±0.02	0.52 ±0.03	0.67 ±0.04	0.77 ±0.03	0.90 ±0.00
Bovine normal lactoferrin	0.35 ±0.04	0.42 ±0.03	0.45 ±0.02	0.46 ±0.03	0.51 ±0.04	0.61 ±0.02	0.70 ±0.01	0.79 ±0.04
Goat normal lactoferrin	0.33 ±0.03	0.35 ±0.03	0.42 ±0.02	0.51 ±0.04	0.55 ±0.03	0.59 ±0.02	0.69 ±0.01	0.79 ±0.01
Human normal lactoferrin	0.31 ±0.02	0.31 ±0.02	0.32 ±0.00	0.32 ±0.02	0.32 ±0.01	0.34 ±0.04	0.34 ±0.01	0.34 ±0.02
Ovoferrin	0.19 ±0.02	0.22 ±0.04	0.24 ±0.04	0.29 ±0.08	0.23 ±0.04	0.22 ±0.01	0.24 ±0.02	0.20 ±0.01
Bovine transferrin	0.32 ±0.02	0.37 ±0.01	0.36 ±0.02	0.37 ±0.01	0.37 ±0.02	0.37 ±0.02	0.34 ±0.02	0.24 ±0.02
Human transferrin	0.28 ±0.03	0.30 ±0.04	0.32 ±0.02	0.35 ±0.02	0.36 ±0.01	0.34 ±0.02	0.31 ±0.01	0.33 ±0.01

表一、牛乳抗牛乳乳鐵蛋白抗體 IgG 對牛乳、牛常乳、牛常乳及人常乳乳鐵蛋白、乳清鐵蛋白、牛與人血漿中運鐵蛋白等抗原之 ELISA 親和特異性差異
Table 1 The difference of affinity specific of anti-bovine colostral lactoferrin IgG against bovine colostral, bovine normal, goat normal and human normal lactoferrin, ovoferrin, bovine and human transferrin
Affinity specific of anti-bovine colostral lactoferrin IgG was determined by ELISA method

Concentration (ng/ml)	0.01	15.63	31.25	62.50	125.00	250.00	500.00	1000.00
Bovine colostral lactoferrin	0.16 ±0.01	0.30 ±0.00	0.37 ±0.01	0.47 ±0.01	0.52 ±0.02	0.54 ±0.01	0.60 ±0.01	0.67 ±0.01
Bovine normal lactoferrin	0.16 ±0.01	0.22 ±0.01	0.28 ±0.01	0.32 ±0.02	0.41 ±0.02	0.47 ±0.01	0.53 ±0.01	0.54 ±0.01
Goat normal lactoferrin	0.15 ±0.01	0.26 ±0.01	0.34 ±0.01	0.41 ±0.01	0.47 ±0.01	0.49 ±0.01	0.55 ±0.02	0.61 ±0.01
Human normal lactoferrin	0.11 ±0.01	0.13 ±0.01	0.14 ±0.00	0.14 ±0.01	0.14 ±0.01	0.22 ±0.03	0.21 ±0.05	0.25 ±0.04
Ovoferrin	0.12 ±0.01	0.12 ±0.02	0.12 ±0.03	0.13 ±0.01	0.13 ±0.02	0.14 ±0.01	0.13 ±0.01	0.11 ±0.01
Bovine transferrin	0.16 ±0.01	0.15 ±0.01	0.15 ±0.01	0.16 ±0.01	0.16 ±0.01	0.17 ±0.01	0.16 ±0.01	0.16 ±0.00
Human transferrin	0.14 ±0.01	0.14 ±0.01	0.14 ±0.00	0.15 ±0.01	0.14 ±0.01	0.15 ±0.00	0.14 ±0.01	0.15 ±0.01

表四、層析法之乳鐵蛋白對於抗乳鐵蛋白抗體 IgG 或 IgY-免疫親和式層析法的最大吸附量 (Qmax) 與解離常數 (Kd)
Table 4 Binding parameters of anti-lactoferrin IgG- or IgY-immunoadsorbent chromatography for lactoferrin

Parameters	Chromatography	
	IgG	IgY
Commercial bovine colostral LF		
Qmax*	0.017	0.012
Kd**	2.60 × 10 ⁻⁷	4.00 × 10 ⁻⁷
Commercial bovine normal LF		
Qmax*	0.010	0.010
Kd**	0.60 × 10 ⁻⁶	4.00 × 10 ⁻⁶
Goat normal whey		
Qmax*	0.002	0.002
Kd**	3.13 × 10 ⁻⁷	3.78 × 10 ⁻⁷

* binding capacity (mg / per ml wet gel)

** dissociation constant (M)

表三、乳鐵蛋白抗體 IgG 或 IgY-免疫親和式層析法純化牛乳、牛常乳及人常乳乳鐵蛋白之比活性及純化倍數
Table 3 The specific activity, purification fold and recovery of lactoferrin from bovine colostral, bovine normal, goat normal whey recovered by anti-lactoferrin IgG- or IgY-immunoadsorbent chromatography
Specific activity of lactoferrin was determined by ELISA method

Specific activity	Chromatography		
	IgG	IgY	
Commercial bovine colostral LF (1.0000)	Commercial bovine colostral LF (control)	0.178	0.121
	Commercial bovine normal LF	0.095	0.098
	Goat normal whey (3.78 × 10 ⁻²)	0.175	0.070
Commercial bovine normal LF	Commercial bovine normal LF	0.178	0.121
	Goat normal whey	0.095	0.098
	Purification fold**	2.000	0.800

*ELISA value (A_{405 nm}) / mg protein

**specific activity of purified LF / specific activity of LF in the starting sample

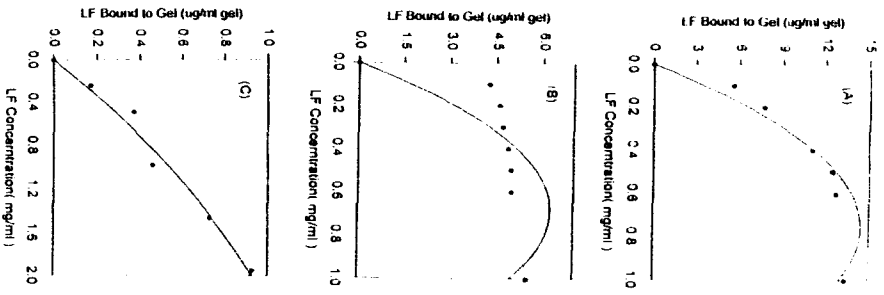


圖 1 抗乳鐵蛋白抗體 IgG-免疫親和式膠體對於乳鐵蛋白之等溫吸附曲線
 apparent adsorption isotherm of lactoferrin by anti-lactoferrin IgG-immunoaffinity chromatography: (A) commercial bovine colostrum LF, (B) commercial bovine normal LF and (C) goat normal whey.

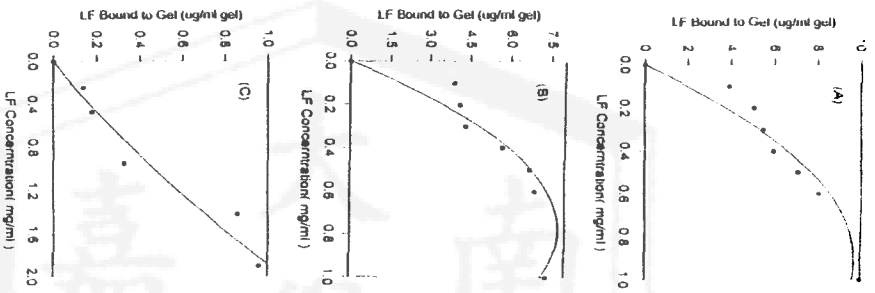


圖 2 抗乳鐵蛋白抗體 IgY-免疫親和式膠體對於乳鐵蛋白之等溫吸附曲線
 apparent adsorption isotherm of lactoferrin by anti-lactoferrin IgY-immunoaffinity chromatography: (A) commercial bovine colostrum LF, (B) commercial bovine normal LF and (C) goat normal whey.

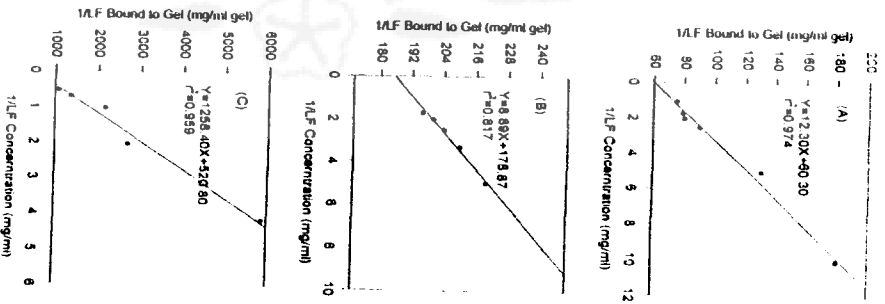


圖 3 抗乳鐵蛋白抗體 IgG-免疫親和式膠體對於乳鐵蛋白之 Lineweaver Burk 直線
 Lineweaver Burk line of lactoferrin by anti-lactoferrin IgG-immunoaffinity chromatography: (A) commercial bovine colostrum LF, (B) commercial bovine normal LF and (C) goat normal whey.

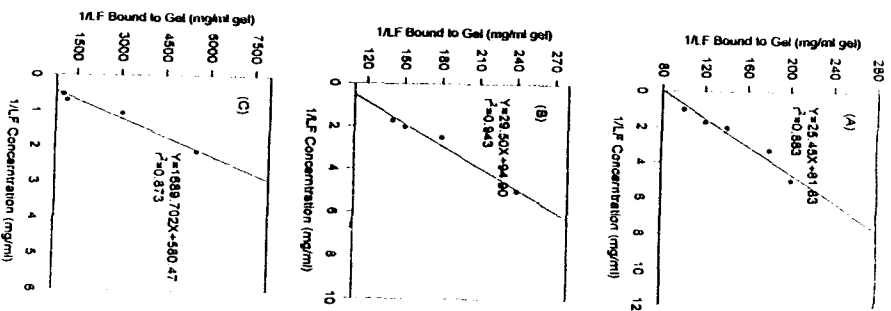


圖 4 抗乳鐵蛋白抗體 IgY-免疫親和式膠體對於乳鐵蛋白之 Lineweaver Burk 直線
 Lineweaver Burk line of lactoferrin by anti-lactoferrin IgY-immunoaffinity chromatography: (A) commercial bovine colostrum LF, (B) commercial bovine normal LF and (C) goat normal whey.