

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

豬血 IgG 蛋白酶水解物安定性之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-041-005-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：嘉南藥理科技大學食品衛生系

計畫主持人：杜艷櫻

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 92 年 10 月 7 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 豬血 IgG 蛋白□水解物安定性之研究

Studies on stability against proteases of pig IgG

計畫編號: NSC 91-2313-B-041-005

執行期限: 自民國 91 年 8 月 1 日起至民國 92 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

將丙型球蛋白 (IgG) 經木瓜□或胃蛋白□水解去除 Fc 部分僅保留 Fab 部分可減少 immunogenic 效果。以自製免疫親和式層析管柱純化 Fab 部分, 再以 ELISA 法測定 IgG 經不同蛋白□水解前後之抗原結合性變化, 並比較其差異。有關比較 IgG 及其 Fab 耐熱活性差異之研究很少。故探討不同溫度及添加物對 IgG 及其 Fab 耐熱活性之影響。豬血 IgG 及其以木瓜□及胃蛋白□水解之 Fab 樣品液分別在 60、70、80、90 及 100 ± 3 加熱 1 分鐘後, 殘存活性百分比在 60 IgG 液各為 98%、97%, Fab 為 94%、80%; 在 70 IgG 液為 88%、96%, Fab 為 86%、80%; 在 80 IgG 液為 66%、71%, Fab 為 64%、66%; 在 90 IgG 液為 63%、63%, Fab 為 52%、59%; 在 100 IgG 液為 52%、57%, Fab 為 52%、53%。顯示 IgG 及其 Fab 殘存活性百分比隨溫度增高而逐漸下降, IgG 及其 Fab 的差異並不大。添加不同濃度糖類、胺基酸等各種保護劑在 90 加熱 15 sec 後, 添加糖類者以木瓜□水解效果較好, 可提高 IgG 及其 Fab 相對活性百分比約 40%, 而以胃蛋白□水解者在糖類濃度約 10% 時已達到最高點約 20%。加入胺基酸可提高相對活性百分比至約 10%。甘油在添加濃度 10% 時即可提高至約 30%。各種保護劑比較顯示甘油的效果最好, 其次是高濃度的葡萄糖、果糖及半乳糖等, 而胺基酸的添加效果稍差。

關鍵詞: 豬血 IgG ( -globulin ) 蛋白

□、抗原結合片段 ( fragment antigen binding ; Fab ) 安定性

### 英文摘要

In this study, self-made anti-pig IgG antibody IgY immobilized on the Sepharose gel will be conducted to purify fragment antigen binding ( Fab ) from pig blood IgG hydrolysates against proteases, and the purification results will be compared by ELISA method and discussed the antigenic affinity of anti-pig IgG antibody IgY immunoaffinity chromatography gel. Finally, the stability of pig blood IgG and its Fab to various thermal treatment, add sugars, ad amino acids treatment, will be determined. The results of the thermal stability tests show that the residual binding ability of IgG to antigen decrease with the increasing temperature. Among the thermal protectants, glycerol display the most powerful protecting effect. Addition of 10% glycerol raised the relative IgG activity to up to 30%. Addition of high concentration 50% sugar can also raised the relative IgG activity to up to 40%.

### 二、緣由與目的

血液中富含有用成分如血清白蛋白、丙型球蛋白 ( -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, 豬血多數當作飼料或遭廢棄, 不僅浪費資源而且造成環境污染。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<sup>(1,2,3)</sup>。如何充分利用豬血資源，值得研究探討。

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<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>(6)</sup>。將 IgG 以木瓜□(papain)或胃蛋白□(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<sup>(9)</sup>。

本實驗嘗試將 IgG 經木瓜□或胃蛋白□水解去除 Fc 部分，再以 ELISA 法測定 IgG 經蛋白□水解前後之安定性變化。建立基礎資料供 IgG 純化及應用之參考。

### 三、結果與討論

由前人研究結果<sup>(10,11,12)</sup> 已知溫度對 IgG 活性影響很大，尤其在高溫下愈明顯。但是有關比較 IgG 及其 Fab 耐熱活性差異之研究卻很少。因此嘗試探討不同溫度對 IgG 及其 Fab 活性之影響，豬血 IgG 以木瓜□ (圖 1A) 及胃蛋白□ (圖 1B)

水解前後 IgG 及其 Fab 樣品液分別在 60、70、80、90 及 100 ±3 加熱 1 分鐘後觀察其殘存活性百分比變化，結果如圖 1 (A),(B) 所示。在 60 IgG 液各為 98%、97%，Fab 為 94%、80%；在 70 IgG 液為 88%、96%，Fab 為 86%、80%；在 80 IgG 液為 66%、71%，Fab 為 64%、66%；在 90 IgG 液為 63%、63%，Fab 為 52%、59%；在 100 IgG 液為 52%、57%，Fab 為 52%、53%。綜合以上結果，顯示不同溫度下 IgG 及其 Fab 殘存活性百分比隨溫度增高而逐漸下降，IgG 及其 Fab 之間的差異並不大。

由於上述研究結果顯示 IgG 及其 Fab 在高溫易失活，故嘗試選用食品常見且安定之單醣，如葡萄糖、果糖及半乳糖；雙醣如麥芽糖及蔗糖，另選用胺基酸：胱胺酸、麩胺酸及天門冬胺酸，其他如甘油、山梨醇及麥芽糖醇，配成不同濃度加入，探討對 IgG 保護效果。

圖 2 (A),(B) 顯示 90 加熱 15 sec 後對 IgG 及其 Fab 添加各種糖類在不同濃度 5--50% (w/v) 下之影響。發現以木瓜□ (圖 2A) 水解前後效果較好，可提高 IgG 及其 Fab 相對活性百分比約 40%，而以胃蛋白□ (圖 2B) 水解前後 IgG 及其 Fab 在糖類濃度約 10% 時已達到最高點約 20%。Shimizu 等(1994) 提出 IgY 在高糖濃度下可增強耐熱性之解釋，無糖時 IgY 之色胺酸(tryptophan) 殘基曝露在親水性環境下，易因高溫而裂解；有高糖時 IgY 內部疏水基交互作用增強，其結構較不易被破壞 因此，在高糖濃度糖下可增強 IgY 的熱安定性。圖 3 (A),(B) 顯示添加各種胺基酸及濃度 0.1--2% (w/v) 下，經 90 加熱 15 sec 後，對 IgG 及其 Fab 相對活性百分比，發現加入胺基酸可提高相對活性百分比至約 10%，效果不如添加糖類顯著。此外由胃蛋白□ (圖 3B) 水解前後曲線趨勢發現添加各種胺基酸似乎對 IgG 之 Fab 活性提升比對 IgG 活性提升顯著，但仍須進一步實驗證明之。圖 4 (A),(B) 顯示添加甘油、山梨醇及麥芽糖醇在不同濃

度(0--10%)，經 90 加熱 15 sec 後，對 IgG 及其 Fab 相對活性百分比提升以甘油效果較好，在添加濃度 10%時即可提高至約 30%，甚至比添加糖類顯著。

就實驗中的各種保護劑加以比較，顯示甘油的效果最好，其次是高濃度的葡萄糖、果糖及半乳糖等，胺基酸的添加效果稍差。

#### 四、成果自評

豬血中 useful 成分可以分離純化成高價值的各種血液製劑，如血清白蛋白、丙型球蛋白(  $\gamma$ -globulin; IgG)及凝血因子等。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豬血 IgG 及其 Fab，再以 ELISA 法測定 IgG 經不同蛋白  $\square$  水解前後之抗原結合性變化，並比較其差異。再進一步探討 pH 值、緩衝溶液種類、加熱溫度、保護劑(添加糖類、胺基酸等)、微生物之脂多醣 (lipopolysaccharide) 等對豬血 IgG 及其 Fab(蛋白  $\square$  水解物)活性之影響。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量有限等問題，以建立 IgY 親和式固定分離模式，使其更具實用性。

雞蛋黃 IgY 含量高分離容易，且雞蛋產量大，為 IgY 獲得上之優點，而抗體與抗原之專一性結合反應敏銳，預期不論抗體來源如何，均能製備出極為滿意的親和式膠體。利用此免疫處理雞隻使產生特异性抗體再製成親和式膠體之固定化模式，可廣泛應用於其他有用之蛋白質或酵素的回收以供藥用或快速檢驗，以配合產業界大量生產之目的。

#### 五、參考文獻

1. Gatti, L. and Mannucci, M. 1984. Use of porcine factor VIII in the management of seventeen patients with factor VIII antibodies. *Thromb. Haemostas.* 51 (3) : 379.
2. Hultin, M. B. and Hennessey, J. 1989. The use of poly electrolyte-fractionated porcine factor VIII in the treatment of a spontaneously acquired inhibitor to factor VIII. *Thromb. Res.* 55 : 51.
3. Kessler, C. M. 1994. Porcine factor VIII in factor VIII antibody positive hemophiliacs. *J. Interf. res.* 14 : 175.
4. 潘昭型, 1988, 免疫學, 新士林出版社 p.67。
5. 馬仁和、俞仁妙, 1985. 丙種球蛋白製品概述。 *藥學通報* 20:743。
6. Janeway, C. A. and Rosen, F. S. 1966. The gamma globulins. IV. Therapeutic uses of gamma globulin. *New Eng. J. Med.* 275 : 826-831.
7. Ellis, E. F. and Henney, C. S. 1969. Adverse reactions following administration of human gamma globulin. *J. Allergy* 43 : 45-54.
8. Johnstone, A. and Thorpe, R. 1987. *Immunochemistry in Practice.* Blackwell Scientific Publication. 2ed. Boston.
9. 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.

#### 附加圖表

**表一、抗丙型球蛋白抗體 IgY-免疫親和式層析法純化豬血漿中丙型球蛋白水解液之效果**

Table 1 The effect of hydrated  $\gamma$ -globulin from pig plasma recovered by IgY-immunoaffinity chromatography

Method	undigested ( control ) *	digested*	digested/ control	effect
Papain	0.195± 0.004	0.135± 0.002	69.32 %	1
Trypsin	0.123± 0.003	0.076± 0.002	61.79 %	0.89
Pepsin (pH4.0)	0.115± 0.004	0.063± 0.004	54.78 %	0.78

\*ELISA value ( absorbance 490 nm )

**圖 1 豬血丙型球蛋白 IgG 及其 Fab 在不同溫度下之殘存活性百分比 (A) 木瓜蛋白酶水解 (B) 胃蛋白酶水解 (pH 4.2)**

Fig. 1 Residual IgG activity percentage of IgG and Fab of IgG heated at different temperature ( A ) papain treated ( B ) pepsin treated ( pH 4.2 )

**圖 2 不同濃度糖類對豬血丙型球蛋白 IgG 及其 Fab 在相對活性百分比之影響 (A) 木瓜蛋白酶水解 (B) 胃蛋白酶水解 (pH 4.2)**

Fig. 2 Effects of various levels of sugar on the relative IgG activity percentage of IgG and Fab of IgG heated at 90 °C for 15 sec. ( A ) papain treated ( B ) pepsin treated ( pH 4.2 )

**圖 3 不同濃度胺基酸對豬血丙型球蛋白 IgG 及其 Fab 在相對活性百分比之影響 (A) 木瓜蛋白酶水解 (B) 胃蛋白酶水解 (pH 4.2)**

Fig. 3 Effects of various levels of amino acids on the relative IgG activity percentage of IgG and Fab of IgG heated at 90 °C for 15 sec. ( A ) papain treated ( B ) pepsin treated ( pH 4.2 )

**圖 4 不同濃度糖醇類對豬血丙型球蛋白 IgG 及其 Fab 在相對活性百分比之影響**

(A) 木瓜□水解 (B) 胃蛋白□水解 (pH 4.2)

Fig. 4 Effects of various levels of sugar alcohol on the relative IgG activity percentage of IgG and Fab of IgG heated at 90 for 15 sec.  
(A) papain treated (B) pepsin treated (pH 4.2)

