

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

數種家禽蛋黃 IgY 及其 Fab 分子安定性之比較

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2313-B-041-006-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：嘉南藥理科技大學食品科技系

計畫主持人：陳昭誠

共同主持人：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 94 年 8 月 1 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

數種家禽蛋黃 IgY 及其 Fab 分子安定性之比較

The Comparison of Poultry egg yolk IgY and their Fab Molecular Stability

計畫編號: NSC 93-2313-B-041-006

執行期限: 自民國 93 年 8 月 1 日起至民國 94 年 7 月 31 日

主持人: 陳昭誠 執行機構及單位: 嘉南藥理科技大學食品科技系

一、中文摘要

IgY 在醫療方面的應用已被使用在傳染性痢疾的治療和齲齒預防有很好功效。應用免疫親和式層析法純化抗體(IgY)或抗原具有很好的效率,可得到很好專一性及產能的抗體或抗原。許多相關研究報導皆以雞蛋蛋黃中的免疫球蛋白(IgY)為研究對象,然而在臺灣常見的數種家禽,如鴨蛋產值僅次於雞蛋,且在華人世界常見的鵪鶉蛋其相關研究闕如,吸引吾人投入研究以瞭解數種家禽蛋 IgY 的性質,並進一步探討具有特異性的 Fab 的性質,並做分子安定性比較,以利未來做為研發相關機能性免疫食品或醫療檢驗的參考。

本研究擬比較數種家禽蛋黃 IgY 及其 Fab 之分子安定性,將 IgY 及其 Fab 分子在不同蛋白質變性劑作用下、鹽類之種類與濃度及保護劑種類等因素,探討對 IgY 及其 Fab 分子安定性之影響。期能尋求保護 IgY 及其 Fab 之方法,使 IgY 及其 Fab 在食品上或免疫醫療功能上可發揮其最佳的功效。

研究結果發現雞蛋黃 IgY 加入 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的相對螢光強度值在 330 nm 約為 60%,但加入 4 M Gdn-HCl 變性劑後之相對螢光強度值在 345 nm 為 100%,相差約 40%。而其中鴨蛋黃 IgY 加入 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的相對螢光強度值在 330 nm 約為 70%,但加入 4 M Gdn-HCl 變性劑後之相對螢光強度值在 345 nm 為 100%,相差約 30%。鵪鶉蛋黃 IgY 加入 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的相對螢光強度值在 330 nm 約為 55%,但加入 4 M Gdn-HCl 變性劑後之相對螢光強度值

在 345 nm 為 100%,相差約 45%。由此推測鴨蛋黃 IgY 分子結構安定性比雞蛋黃 IgY 和鵪鶉蛋黃 IgY 要好。

另外在鹽類對數種家禽蛋黃 IgY 及其 Fab 分子安定性之影響的研究結果顯示 1.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的存在同樣有助於安定蛋黃 IgY 及其 Fab 分子結構的效果。以上證實在 Gdn-HCl 變性劑下 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的存在有助於安定 IgY 分子結構的效果。

關鍵詞: 雞蛋、鴨蛋、鵪鶉蛋、IgY、Fab、分子安定性

英文摘要

Therapeutic applications of IgY were demonstrated in animals by using it for treatment of infectious diarrheal diseases and protection against dental caries by passive immunization. Use egg yolk as a potential source of immunological food supplement because of high immunoglobulin content, simple collection, and relative abundance. The use of IgY as a source of immunoaffinity chromatography has not been well developed, and some biochemical properties of IgY utilized as an antibody for immunoaffinity chromatography is yet unclear. Therefore, improving the use of antibody, especially IgY, is more useful and convincing for Fab purification. In this study, IgY and Fab from IgY hydrolysates against proteases will be purified by immunoaffinity chromatography column, and the purification results will be compared by ELISA method and discussed the antigenic affinity of

IgY and Fab. Finally, the molecular stability of IgY and its Fab to various protest treatment, add salts treatment, and ELISA values of IgY and its Fab against protein denature treatment will be determined.

Keywords : Hen egg、duck egg、quail egg、IgY、Fab、molecular stability

二、緣由與目的

IgY 可作為較便宜的特異性抗體來源,然而 Parvari 等指出 IgY 源於雞隻,仍會與哺乳動物的 IgG 有差異。若口服 IgY 特別是嬰兒恐有過敏之虞,此外,平時即對蛋的蛋白質過敏的少數過敏體質的人,更需減低或去除引起過敏的過敏原。如前所述 IgY 之 Fc 是免疫球蛋白造成過敏的主要部分。Ahren 和 Svennerholm 亦發現抗 CFA/I 抗體之 Fab 較未切除 Fc 之全抗體不易造成腹瀉,因此不論在口服抗體或注射高純度的抗體都需要把抗體之 Fc 切除,如此既可去除過敏原又可保留抗原-抗體結合的功能。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 IgY 及其 Fab,再以 ELISA 法測定 IgY 經不同蛋白鈰水解前後之抗原結合性變化,並比較其差異。而變性劑 guanidine hydrochloride (Gdn-HCl)常用研究蛋白質變性。而有關於 IgY 及其 Fab 在變性劑 guanidine hydrochloride 作用下,不同鹽類對其分子結構之影響的研究闕如,因此,本研究擬探討比較數種家禽蛋黃 IgY 及其 Fab 分子在不同蛋白質變性劑作用下、與不同保護劑共存等條件下,鹽類之種類與濃度及保護劑種類等因素對 IgY 及其 Fab 分子安定性之影響。並以家禽蛋黃中唯一抗體 (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。本研究重點方向如下:1、數種家禽蛋黃 IgY 粗抗體之純化。2、數種家禽

蛋黃 IgY 經蛋白鈰作用以製備其 Fab 之條件探討。3、免疫親和式層析法純化 IgY 及其 Fab 及其抗原結合性之研究。4、IgY 及其 Fab 分子安定性之研究。

三、結果與討論

研究指出數種家禽蛋黃 IgY 加入蒸餾水、1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 4 \text{ M Gdn-HCl}$ 、4 M Gdn-HCl 作用下,使用螢光分光光譜儀測定在 295 nm 激發波長下,掃描 310~380 nm,求得變性波長,繪出其掃描圖如圖一~三所示。其中雞蛋黃 IgY 加入 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 4 \text{ M Gdn-HCl}$ 之溶液,經過變性後在 310~380 nm 波長掃描下,發現在 345 nm 時的螢光強度最高,因此以此波長做為變性後之釋放波長,供測定溶液中變性 IgY 之螢光強度。

從圖一~三中比較數種家禽蛋黃 IgY 之變化,發現雞蛋黃 IgY 加入 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的相對螢光強度值在 330 nm 約為 60%,但加入 4 M Gdn-HCl 變性劑後之相對螢光強度值在 345 nm 為 100%,相差約 40%。而其中鴨蛋黃(圖二)IgY 加入 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的相對螢光強度值在 330 nm 約為 70%,但加入 4 M Gdn-HCl 變性劑後之相對螢光強度值在 345 nm 為 100%,相差約 30%。圖三鵪鶉蛋黃 IgY 加入 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的相對螢光強度值在 330 nm 約為 55%,但加入 4 M Gdn-HCl 變性劑後之相對螢光強度值在 345 nm 為 100%,相差約 45%。由此推測鴨蛋黃 IgY 分子結構安定性比雞蛋黃 IgY 和鵪鶉蛋黃 IgY 要好。其中 IgY 之來源即由雞血清 IgG,雞血清 IgG 含量約為 5 mg/ml,而蛋黃中 IgG (IgY) 含量約為 10 mg/ml;且兩者之胺基酸的組成差異不大,由此可推知 IgG 由血清轉移至蛋黃中成 IgY 時,在蛋白質部份無顯著的修飾作用。

另外在數種家禽蛋黃 IgY 其 Fab 的結果如圖四~六所示,其結果亦顯

示鴨蛋黃 IgY 分子結構比雞蛋黃 IgY 和鵝蛋黃 IgY 要安定。但比其本身的 IgY 較為不安定。

在鹽類對數種家禽蛋黃 IgY 分子安定性之影響的研究結果顯示，數種家禽蛋黃 IgY 分別含濃度 1.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 MgCl_2 、 CaCl_2 、 NaCl 、 CH_3COONa ，及含 Gdn-HCl 使最終濃度為 3.0 M，使用螢光分光光譜儀測定在 295 nm 激發波長，在 345 nm 釋放波長下以加入 4.0 M Gdn-HCl 的溶液所測得的螢光強度最高做為 100%，以蒸餾水做為 0%，求出各溶液之相對螢光強度。其結果如圖七~九所示，在圖七有關雞蛋黃 IgY 部份，發現含 1.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 之相對螢光強度值在 84% 左右，其餘含蒸餾水，1 M MgCl_2 、 CaCl_2 、 NaCl 、 CH_3COONa 之相對螢光強度值均大於 100%，以 MgCl_2 、 CaCl_2 較大，顯示 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的存在有助於安定雞蛋黃 IgY 分子結構的效果。在圖八鴨蛋黃 IgY 部份，發現含 1.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 之相對螢光強度值在 85% 左右，其餘含蒸餾水，1 M MgCl_2 、 CaCl_2 、 NaCl 之相對螢光強度值均大於 100%，其中以 NaCl 之相對螢光強度值較大，顯示 1.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的存在同樣有助於安定鴨蛋黃 IgY 分子結構的效果。在圖九鵝蛋黃 IgY 部份，發現含 1.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 之相對螢光強度值在 81% 左右，其餘含蒸餾水，1 M MgCl_2 、 CaCl_2 、 NaCl 之相對螢光強度值均大於 100%，其中以 NaCl 之相對螢光強度值較大，顯示 1.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的存在同樣有助於安定鵝蛋黃 IgY 分子結構的效果。

另外在鹽類對數種家禽蛋黃 IgY 其 Fab 分子安定性之影響的研究結果如圖十~十二所示，其結果亦顯示 1.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的存在同樣有助於安定蛋黃 IgY 其 Fab 分子結構的效果。以上證實 在 Gdn-HCl 變性劑下 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的存在有助於安定 IgY 分子結構的效果。Goto 等以免疫球蛋白

之輕鏈的變異區(variable region)及恒定區(constant region)片段為材料，發現在 Gdn-HCl 變性劑下 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 對兩者皆有增加其分子結構安定性之功能，與本實驗有同樣的情形；與其結果比較，由於免疫球蛋白是完整的分子結構，因此不若免疫球蛋白之輕鏈的變異區及恒定區片段破壞劇烈，表現較其安定。von Hippel 和 Wong 曾提出硫酸根離子(sulfate ion)有保護球蛋白結構之功能，此外 Arakwa 和 Timasheff 亦發現由於 Na_2SO_4 具有硫酸根離子所以有安定牛血清白蛋白(bovine serum albumin)和溶菌鈣(lysozyme)分子結構之功能，據此推測 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 因為帶有硫酸根離子，具有安定 IgY 及其 Fab 分子之效果。

四、成果自評

機能性免疫食品受到大眾歡迎，除了醫療外，尚包括免疫機能較差的嬰兒與老年人的需求(臺灣即將邁入高齡化社會)，和預防保健意識的提昇，相信未來必能成為保健食品的主流！其中蛋黃 IgY 含量高分離容易，且蛋產量大，為 IgY 獲得上之優點，而抗體與抗原之專一性結合反應敏銳。未來，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，利用此免疫處理家禽，產生特異性抗體再製成親和式膠體之模式，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。從這幾年的研究成果，個人相信有助於將免疫學的觀念導入食品科技之研究發展，提供另一個新進的機能性食品或醫藥開發的方向，以提升蛋類、乳類等食品之經濟價值。

本實驗研究工作整體而言完成 95% 以上，成果亦相當可觀，對於 IgY 及其 Fab 分子安定性更進一步瞭解，使其在加工處理上或包裝處理上，能保留更多且安定的 IgY 及其 Fab；提

供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，並可將免疫機能性食品導入食品業，加速免疫機能性食品在臺灣之研發！

五、參考文獻

1. 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.
2. Tacket, C. D., Losnsky, G., Link, H., Hoang, Y., Guerry, P., Hilpert, H., and Levine, M. M. 1988. Protection by milk immunoglobulin concentrate against oral challenge with enterotoxigenic *E. coli*. *New Eng. J. Med.* 318:1240.
3. von Hippel, P. H. and Wong, K. Y. 1965. On the conformational stability of globular proteins. *J. Biological Chemistry* 240 (10):3909--3923.
4. Arakawa, T. and Timasheff, S. N. 1982. Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions. *Biochemistry* 21: 6545--6552.
5. Akerstrom, B., Brodin, T., Reis, K., and Bjorck, L. 1985. Protein G : a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Immunol.* 135:2589.
6. 陳昭誠 (1998) 牛乳免疫球蛋白 G 安定性之研究。國立臺灣大學食品科技研究所博士論文。臺北市。
7. 松田 幹、中村 良 (1993) IgG 抗體 卵母細胞 集積構造。 *農化* 67: 1426-1429.
8. Salahuddin, A. and Tanford, C. (1970) Thermodynamics of the denaturation of ribonuclease by guanidine hydrochloride. *Biochemistry* 9(6): 1342-1347.
9. Goto, Y., Ichimura, N. and Hamaguchi, K. (1988) Effects of ammonium sulfate on the unfolding and refolding of the variable and constant fragments of an immunoglobulin light chain. *Biochemistry* 27: 1670-1677.
10. Shimizu, M., Nagashima, H., Hashimoto, K., and Suzuki, T. 1994. Egg yolk antibody (IgY) stability in aqueous solution with high sugar concentrations. *J. Food Sci.* 59:763.
11. Shimizu, M., Nagashima, H., Sano, K., Hashimoto, K., Ozeki, K., Tsuda, K. and Hatta, H. 1992. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56 : 270-274.
12. Chang, H. M., Lu, T. C., Chen, C. C., and Tu, Y. Y. 2000. Isolation of immunoglobulin from egg yolk by anionic polysaccharides. *J. Agric. Food Chem.* 48:995-999.
13. 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.
14. Glover, F. A. 1985. Ultrafiltration and reverse osmosis for the dairy industry. *Tech. Bull.* 5:167.
15. Li-Chan, E., Kummer, A., Losso, J. N., Kitts, D.D., and Nakai, S. 1995. Stability of bovine immunoglobulins to thermal treatment and processing. *Food Res. Int.* 28:9.
16. Sanchez, L., Peiro, J. M., Castillo, H., Perez, M. D., Ena, J. M. and Calvo, M. 1992. Kinetic parameters for denaturation of bovine milk lactoferrin. *J. Food Sci.* 57:873.

附加圖表