

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

應用雞蛋黃 IgY 精製與檢測牛乳中鹼性磷酸酵素

Application of Hen Egg Yolk IgY to Separate and Assay Bovine Milk Alkaline Phosphatase

計畫編號: NSC 89-2214-E-041-004

執行期限: 自民國 89 年 8 月 1 日起至民國 90 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衛生系

一、中文摘要

鹼性磷酸酶(ALP)是一種在未經殺菌或熱處理的牛乳中常被發現的天然酵素,牛乳經 62.8°C、30 min 或 71~75°C、15~30 sec 熱處理,可殺死牛乳中非孢子型病原菌,但同樣地也使鹼性磷酸酶失活。因此,鹼性磷酸酶活性檢測成為牛乳殺菌程度的指標,或牛乳經殺菌後儲存時間長短之判定,是牛乳品質安全分析中的重要項目。牛乳中鹼性磷酸酶亦可能來自污染的微生物所分泌,但現有的檢測方法確無法分辨,此乃標準檢測方法缺乏專一性所致。本實驗中將嘗試以操作簡便且易於量化生產之免疫親和式膠體層析法來純化 ALP 和製備 anti-bovine ALP IgY 抗體。結果顯示雞蛋黃粉 IgY 抗體之 ELISA 值在在免疫處理後第八週高達 0.5 以上,直至第十週仍保持 0.4。以 ALP-Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity chromatography 分離 Anti-ALP IgY, 得到其 binding capacity (q_m) and dissociation constant (K_d) 顯示彼此間有很強的抗原與抗體作用力。另外,在以 anti-ALP IgY Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity chromatography 分離 ALP, 得到其 binding capacity (q_m) and dissociation constant (K_d) 亦顯示彼此間有很強的抗原與抗體作用力。

關鍵詞: 牛乳鹼性磷酸酶、IgY、免疫親和式層析法、精製

英文摘要

Alkaline phosphatase (ALP) is a native enzyme found in unpasteurized milk

including bovine milk. Heat treatment of milk at 62.8°C for 30 min or 71~75°C for 15~30 sec, which kills nonsporeforming pathogenic microorganisms, will also inactivate ALP. Testing milk for ALP activity has become a common practice for regulatory and quality control purposes. ALP activity in milk are nonspecific and do not differentiate between milk and microbial ALP. In this study, we used the immunoaffinity chromatography method to separate alkaline phosphatase from milk and anti-bovine ALP IgY antibodies from hen egg yolk. Results show that antibody (IgY) ELISA values of yolk powder was almost as high as 0.5 the 8th week, after the initial immunization treatment. However, antibody ELISA values against ALP in yolk powder was 0.4 for 10 weeks. Different amounts of IgY purified by APO-Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity chromatography were applied to the same column to determine the binding capacity (q_m) and dissociation constant (K_d) of ALP-Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity gel for IgY specific against ALP. Different amounts of ALP purified by anti-ALP IgY Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity chromatography were applied to the same column to determine the binding capacity (q_m) and dissociation constant (K_d) of anti-ALP IgY Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity gel for ALP. It was apparent that the binding capacity (q_m) of anti-ALP IgY immunoaffinity gel had very strong Ag-Ab interaction force.

Keywords: Bovine milk alkaline phosphatase、IgY、Immunoaffinity gel chromatography、Purification

二、緣由與目的

鹼性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, 簡寫 ALP, (E.C. 3.1.3.1; phosphatase))是一種在未經殺菌或熱處理的牛乳中常被發現的天然酵素, 屬醣蛋白構造含有部分涎酸(sialic acid), 分子量為 187 kDa, 等電點(pI)約在 5.4~6.0, 其活性能被 Mg^{+2} 、 Mn^{+2} 所致活, 而受 Zn^{+2} 等抑制。對於 γ 射線之抵抗力極強, 以 $88 \times 10^4 \gamma$ 照射時僅有 5% 失活。牛乳經 $62.8^\circ C$ 、30 min 或 $71\sim 75^\circ C$ 、15~30 sec 熱處理, 可殺死乳中非孢子型病原菌, 但同樣可使 ALP 失活。因此, ALP 活性檢測成為牛乳殺菌是否足夠的指標, 或牛乳經殺菌後儲存時間長短之判定, 是牛乳品質安全分析中的重要項目。現有標準檢測方法常有誤判現象發生, 因牛乳中 ALP 除來自生乳外亦來自污染的微生物所分泌, 所以經過殺菌的牛乳中殘存有 ALP 並不完全是殺菌不足所造成, 可能是殺菌後受微生物污染所造成, 但是, 現有的檢測方法確無法分辨, 此乃標準檢測方法缺乏專一性所致。而利用抗體-抗原專一性結合作用的 ELISA 法(酵素連接免疫分析法)即可彌補此檢驗上的缺點, 利用抗牛乳鹼性磷酸酶 IgY 抗體(anti-bovine ALP IgY)和牛乳 ALP 的抗體-抗原專一性結合作用, 可提高其檢測的專一性與靈敏性, 正確區分牛乳中 ALP 來源。

本實驗之免疫親和式膠體是以經純化且具特異性之牛乳 ALP 或 anti-bovine ALP IgY 與經 CNBr 活化之 Sepharose 膠體以共價鍵結合製備, 用操作簡易且耐用性佳之免疫親和式膠體管柱層析法(immunoaffinity chromatography)純化具特異性 IgY 及牛乳 ALP。因此, 本研究嘗試以 ALP 免疫處理來亨雞後, 比較其血清及蛋黃中抗體生成量變化, 並且以免疫親和式膠體層析法分離精製 anti-bovine ALP IgY 抗體, 再以精製 anti-bovine ALP IgY 製備免疫親和式膠體管柱並純化 ALP。期望得到純度高和回收率高且又可

量化生產之牛乳 ALP, 及可應用在 ELISA 法供檢測用之 anti-bovine ALP IgY 抗體試劑。另外, 將精製純化之牛乳 ALP 和雞蛋黃 anti-bovine ALP IgY 抗體做食品上之應用性探討。

三、結果與討論

本研究以 ALP 免疫處理來亨雞, 探討其蛋黃液中抗體之生成變化。有關 ALP 抗原純化, 取市售 ALP 經過 Macro-Prep High Q 膠體第一次純化, 再以 Sephacryl S-200 管柱層析膠體分離純化, 其結果如圖 1 及圖 2 所示, 在圖 1 中得知在收集管數第 60~90 管為 ALP 活性最高的部份, 再以收集之 ALP 液以 Sephacryl S-200 管柱層析膠體分離, 如圖 2 所示在收集管數第 18~45 管為 ALP 活性最高的部份, 分析純化結果如表 1 所示, 顯示比活性由原來 3.1 U/mg 增為 111.9 U/mg, 純化倍數為原來 36 倍。經透析、濃縮後, 與佐劑乳化後製備疫苗, 來亨雞經一次注射及隔週補強注射, 共補強注射四次, 每次注射前採取少量血, 並將免疫前後之產蛋收集, 以 ELISA 法測量雞血清中抗 ALP 抗體之活性及 titer 變化(圖 3, 4), 隨著稀釋倍數的增加, 抗 ALP 抗體之活性明顯減低, 可見經免疫後抗 ALP 抗體之產量相當多。另外, 由圖 3 結果中得知, 隨著免疫日數的增加, 實驗所得之雞血清中抗 ALP 抗體之 ELISA 值, 在第二次免疫後來亨雞雞血清液 ELISA 值為 0.4~0.6 之間, 此後 ELISA 值持續上升至第 3 週的 0.6 才開始下降。而 titer 值如圖 4 所示, 在第二次免疫後的第 2、3 週都可達到最高的 titer 值 10^6 。另外, 以 ELISA 法測量蛋黃粉中抗 ALP 抗體之活性及 titer 變化(圖 5, 6), 經免疫後抗 ALP 抗體之產量相當多。由圖 5 結果中得知, 隨著免疫日數的增加, 實驗所得之蛋黃粉中抗 ALP 抗體之 ELISA 值, 在第 2 次免疫後來亨雞蛋黃粉 ELISA 值為 0.3 以上, 此後 ELISA 值持續上升至第 8 週的 0.5 以上才開始下降。而 titer 值如圖 6 所示, 在第二次免疫後的第 8 週都可達到最高的 titer 值 10^5 。與前人研究抗酪蛋白抗體、抗丙

型球蛋白抗體、抗乳鐵蛋白抗體結果比較，可看出抗 ALP 抗體之 titer 值變化相似。此結果可印證一事實即良好的抗原至少約需具有 3-5kD 的分子量才能誘發良好的抗體反應。

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 ALP。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。

實驗研究工作由於設備及經費受限，整體而言完成 90% 以上，成果亦相當可觀，現有一篇正著手投稿國外著名 SCI 食品相關期刊。本研究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. Vega-Warner, A. V., Wang, C. H., Smith, D. M. and Ustunol, Z. 1999. Milk alkaline phosphatase purification and production of polyclonal antibodies. *J. Food Sci.* 64(4):601-605.
2. Murthy, G. K., Kleyn, D. H., Richardson, T., and Rocco, R. M. 1992 Alkaline phosphatase methods. Ch. 14 in *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, p. 413-431. American Public Health Assoc., Washington, DC.
3. Murthy, G. K. and Kaylor, L. O. 1990. Evaluation of APHA and AOAC II methods for phosphatase in butter and differentiation of milk and microbial phosphatases by agarose-gel electrophoresis. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 73:681-687.
4. Chiu, C. K. and Etzel, M. R. 1997. Fraction of lactoperoxidase and lactoferrin from bovine whey using a cation exchange membrane. *J. Food Sci.* 62(5):996-1000.
5. 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.
6. Otake, S., Nishihara, Y., Makimura, M., Hatta, H., Kim, M., Tamamoto, T. and Hirasahawa, M. 1991. Protection of rats against dental caries by passive immunization with hen-egg-yolk antibody(IgY). *J. Dent. Res.* 70:162-166.
7. Buchta, R. 1991. Ovine lactoferrin : isolation from colostrum and characterization. *J. Dairy Research.* 58 : 211-218.
8. Chen, J. P. and Wang, C. H. 1991. Microfiltration affinity purification of lactoferrin and immunoglobulin G from cheesewhey. *J. Food Sci.* 56 : 701-706, 713.
9. Bradford, M. M. 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
10. Harlow, E. and Lane, D. 1988. *Antibodies*. 1st ed. Cold Spring Harbor Laboratory Co., New York.

附加圖表

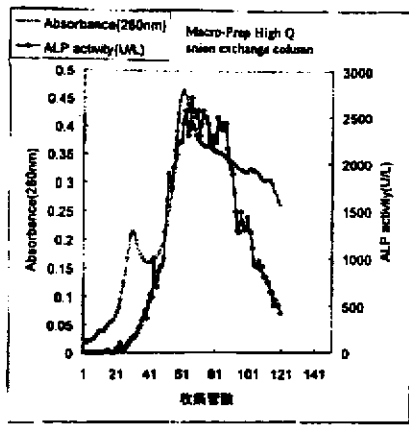


图1. 市售ALP经Macro-Prep High Q层析图

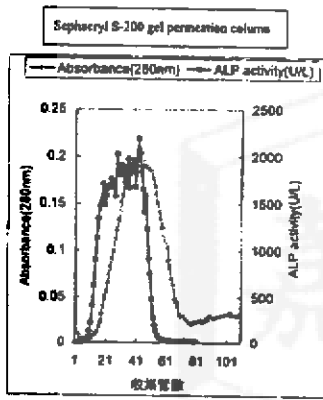


图2. 经Sephacryl S-200层析图

Column purification of bovine milk alkaline phosphatase						
	Volume (mL)	Protein (mg/mL)	Activity (U/mL)	Total units	Specific Activity (U/mg)	Yield (%)
Crude ALP	5.0	9.52	29.3245	146.6225	3.0803	100
Macro-Prep High Q	57	0.0419	1.4763	84.1491	35.2339	57.3917
Sephacryl S-200	40	0.0124	1.3886	55.5440	111.9839	37.8623
计算公式	A	B	C	A×C	C/B	
				Total units	Specific activity	Purification factor
				146.6225	3.0803	1.0
				84.1491	11.4385	
				55.5440	36.3549	
				±100%	13.0803	

表1. 市售ALP经不同层析法之比较

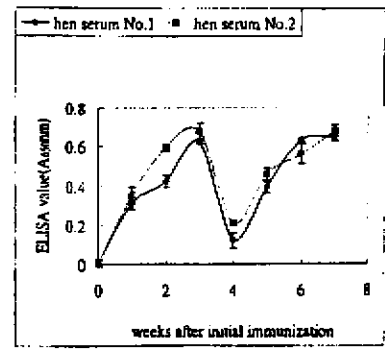


图3. 免疫期间雞血清抗ALP抗体之ELISA值

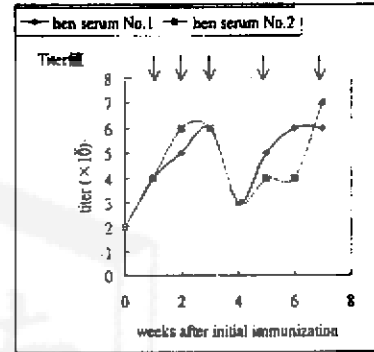


图4. 免疫期间雞血清抗ALP抗体 titer 值

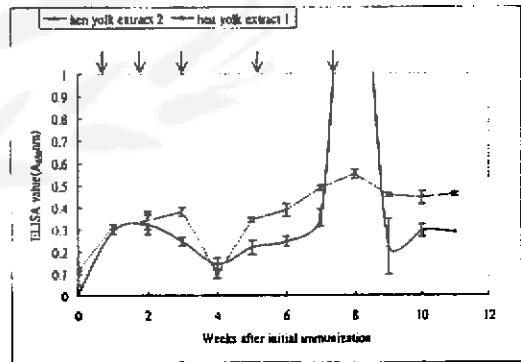


图5. 抗ALP免疫雞蛋黃粉之ELISA值变化图

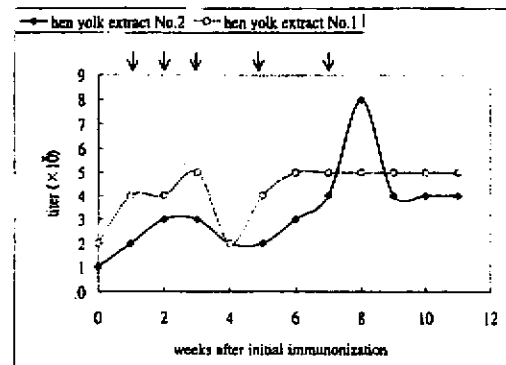


图6. 抗ALP免疫雞蛋黃粉之titer值变化图