

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 純化與檢測黃豆中 BBI

Application of Hen Egg Yolk IgY to Purify and Assay Soybean BBI

計畫編號: NSC 90-2313-B-041-011

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: 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

有些蛋白酶抑制劑在體外和動物模式系統中，可有效預防或抑制癌症的轉移與發生，其中一種從黃豆得到的蛋白酶抑制劑，稱為 Bowman-Birk Inhibitor (BBI)，抑制癌症的轉移與發生特別地有效。BBI 是一種具有抑制胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶活性的蛋白質，分子量 8000 Da，有關純化的 BBI 和 BBI 濃縮物 (BBI concentrate, BBIC) 已經被廣泛研究，在體內和體外系統實驗中，發現純化的 BBI 和 BBI 濃縮物在癌症的生成上有明顯的抑制效果，因此 BBI 已被充當做抗癌藥劑。本實驗期望以免疫親和式膠體層析法得到純度高和回收率高又可量化生產之 BBI 和製備抗 BBI 抗體 (anti-BBI IgY)，可做為大量生產 BBI 之方法，並以抗 BBI 抗體做為偵測黃豆 BBI 之 ELISA 法中所需之藥劑或套組 (kit)，建立可靠的準確分析方法。結果顯示雞蛋黃 IgY 抗體之 ELISA 值在免疫處理後第五週高達 2.1，直至第八週仍保持 0.75。以 BBI-Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity chromatography 分離 Anti-BBI IgY，得到其 binding capacity (q_m) and dissociation constant (K_d) 分別為 0.032 mg IgY/mL wet gel 和 3.0×10^{-7} M，顯示彼此間有很強的抗原與抗體作用力。另外，在以 anti-BBI IgY Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity chromatography 分離 BBI，得到其 binding capacity (q_m) and dissociation constant (K_d) 分別為 0.09 mg BBI/mL wet gel 和 1.91×10^{-7} M，顯示彼此間有很強的抗原與抗體作用力。

關鍵詞：Bowman-Birk Inhibitor (BBI)、

IgY、免疫親和式層析法、純化

英文摘要

Certain protease inhibitors are effective at preventing or suppressing carcinogen-induced transformation in vitro and carcinogenesis in animal model systems. One protease inhibitor, the soybean-derived Bowman-Birk inhibitor (BBI) is particularly effective in suppressing carcinogenesis. BBI is a protein of a molecular weight of 8000 Da with a well-characterized ability to inhibit trypsin and chymotrypsin. BBI has been extensively studied, both as purified BBI and as an extract of soybeans enriched in BBI called BBI concentrate (BBIC). Purified BBI and BBIC have comparable suppressive effects on the carcinogenic process in a variety of in vivo and in vitro systems. BBI appears to be a universal cancer preventive agent. In this study, we used the immunoaffinity chromatography method to separate BBI from soybean and anti-BBI IgY from hen egg yolk. Production of anti-BBI IgY could provide for the development of ELISA methods that would determine BBI contents from soybeans and its processed products. Results show that antibody (IgY) ELISA values of yolk was almost as high as 2.1 at the 5th week, after the initial immunization treatment. However, antibody ELISA values against BBI in yolk was 0.75 for 8 weeks. Different amounts of IgY purified by BBI-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 BBI-Sepharose 4 Fast Flow

immunoaffinity gel for IgY specific against BBI. It was found that q_m was 0.032 mg IgY/mL wet gel and K_d was 3.0×10^{-7} M as determined by Langmuir-type adsorption isotherms. Different amounts of BBI purified by anti-BBI 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-BBI IgY Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity gel for BBI. It was apparent that the binding capacity (q_m) of anti-BBI IgY immunoaffinity gel for commercial BBI was 0.09 mg/mL wet gel. However, the dissociation constant (K_d) (1.91×10^{-7} M) of immunoaffinity gel for commercial BBI.

Keywords : Bowman-Birk Inhibitor (BBI)、IgY、Soybean、Immunoaffinity gel chromatography、Purification

二、緣由與目的

由於我們對蛋白酶抑制劑的瞭解起源於黃豆，瞭解最多的也是黃豆蛋白酶抑制劑，Bowman-Birk Inhibitor (BBI)：黃豆中 BBI 分子量 8 kDa，由 71 個胺基酸所組成之單一胜肽鏈，卻有七個雙硫鍵，故對熱和酸鹼極穩定。是個 double-headed inhibitor，對胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶有不同的 binding site。

近來 BBI 已經被廣泛研究，分別有純化之 BBI 和黃豆萃取物(含 BBI，稱為 BBIC)，發現純化之 BBI 和 BBIC 可在體外(in vitro)和體內(in vivo)系統中，有效抑制癌症的生成。BBIC 在 1992 年 4 月得到美國 FDA(IND no.34671；sponsor, Ann R Kennedy)獲准為研究新試劑，嘗試評估做為人體抗癌藥物。

許多臨床研究證明飲食中含高量的黃豆製品與低癌症有關，特別是對乳癌、結腸癌、前列腺癌（西方國家常見癌症）。亞洲國家，例如日本大量食用黃豆，較低癌症致死率。雖然黃豆中的兩種成分 phytic acid 和 β -sitosterol 可抑制動物致癌，但是 BBI 是已知在黃豆抑

制動物致癌成分中最有效的。在某些特定動物模式致癌系統研究中發現，BBI 和 BBIC 能有效的抑制由 dimethyl hydrazine 所引起的小白鼠結腸癌和肝癌；和 7,12-dimethylbenzanthracene 引起倉鼠的口腔癌；和 3-methylcholanthrene 引起小白鼠的肺癌；和 methylbenzyl nitrosamine 引起小白鼠的食道癌；和放射性引起的淋巴腺癌。

傳統分離純化 BBI 的方法多未盡理想如表一所示，如硫酸鹽沉澱法純度和回收率並不高；而離子交換層析法(以陰離子交換層析法，常用膠體為 DEAD-cellulose)、管柱層析法(常用膠體為 Sephadex G-100)不易擴大規模及連續化生產。本實驗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 BBI。免疫親和式膠體管柱層析法是利用抗原及抗體高度專一性結合作用的原理，將特異性抗體或抗原以共價鍵結結合到固體支持物如 Sepharose 上而後裝填到管柱內，待含有抗原或特異性抗體的混合物緩慢通過管柱時，只有具特異性之抗原和抗體才可高度專一性結合，而其他成分因無法結合則會通過管柱後被沖出。至於結合上的抗原或抗體可以依流洗液中鹽濃度或 pH 值的變化，將其流洗出而達分離精製目的。

三、結果與討論

本研究以 BBI 免疫處理來亨雞，探討其蛋黃液中抗體之生成變化。來亨雞經一次注射及隔週補強注射，共補強注射三次，每次注射前採取少量血，並將免疫前後之產蛋收集，以 ELISA 法測量蛋黃中抗 BBI 抗體之活性及 titer 變化（圖 1, 2），隨著稀釋倍數的增加，抗 BBI 抗體之活性明顯減低，可見經免疫後抗 BBI 抗體之產量相當多。另外，由圖 1 結果中得知，隨著免疫日數的增加，實驗所得之蛋黃液中抗 BBI 抗體之 ELISA 值，在第二次免疫前來亨雞蛋黃液 ELISA 值為 0.4，此後 ELISA 值持續上升至第 5 週的 2.0 才開始下降。而 titer 值如圖 2 所示，

在第四次免疫後的第 5 週都可達到最高的 titer 值 10^7 。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 BBI 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 (BBI 的分子量 8kD) 才能誘發良好的抗體反應。

將免疫親和式層析法應用於純化高純度的抗體，結果如圖 3 所示。發現在收集管數第 28 管有一高峰，將第 27-33 管收集中和其 pH 後，以 ELISA 法定量抗 BBI 抗體。圖 4 為抗 BBI 抗體 IgY 與免疫親和式膠體的等溫吸附曲線，此曲線符合 Langmuir isotherm。若以 Lineweaver Burk 繪圖 (圖 5)，可直接求出 $Q_{max}=0.032$ mg/ml wet gel 與 $K_d = 3.0 \times 10^{-7} M$ 。Ling and Mattison 指出 K_d 值需小於 $10^{-6} M$ ，才使得 90% 以上被吸附之蛋白質不至於被 starting buffer 沖洗出。圖 6 為 BBI 與免疫親和式膠體的等溫吸附曲線，此曲線符合 Langmuir isotherm。若以 Lineweaver Burk 繪圖 (圖 7)，可直接求出 $Q_{max}=0.09$ mg BBI/ml wet gel 與 $K_d = 1.91 \times 10^{-7} M$ 。Ling and Mattison 指出 K_d 值越小表示親和性吸附作用力越強。本研究 K_d 值小於 $10^{-6} M$ ，可知親和性吸附作用力很強。

四、成果自評

由於臺灣加入 WTO 後，開放的自由經濟市場，對於國內產業的打擊相當大，因此產業必須要升級，若與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，其中雞蛋與黃豆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！

因為由雞蛋蛋黃中製備 IgY 有下列優點⁽¹⁵⁾：(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，較易精製；(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 含量較哺乳動物血清或正常乳汁中抗體含量高；(6)雞蛋產

量大，且有逐年增加之趨勢，故極具發展潛力，又因為無需採血或犧牲動物故更符合現今保護動物之要求。八田等⁽¹⁶⁾指出平均一隻產卵雞每年所產下的蛋，其卵黃中所含 IgY 含量約為 40g，此相當 30 隻兔子血清中 IgG 之總和。

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 BBI。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 95% 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. Liener, I. E. 1980. Toxic constituents of plant food stuffs. Academic press, New York.
2. DiBella, F. P. and Liener, I. E. 1969. Soybean trypsin inhibitor. J. Biol. Chem. 244:2824~2829.
3. Feinstein, G. and Feeney, R. E. 1969. Inhibition of human trypsin, plasmin and thrombin by naturally occurring inhibitors of proteolytic enzyme. J. Biol. Chem. 244:1957~1960.
4. Kennedy, A. R., Szuhaj, B. F., Newberne, P. M., and Billings, P. C. 1993. Preparation and production of a cancer chemopreventive agent, Bowman-Birk inhibitor concentrate. Nutr. Cancer. 19:281~302.
5. Yavelow, J., Collins, M., Birk, Y., Troll, W., and Kennedy, A. R. 1985. Nanomolar concentrations of Bowman-Birk soybean protease

- inhibitor suppress X-ray induced transformation in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:5395~5399.
6. Witschi, H. and Kennedy, A. R. 1989. Modulation of lung tumor development in mice with the soybean-derived Bowman-Birk protease inhibitor. *Carcinogenesis*. 10:2275~2277.
 7. von Hofe, E., Newberne, P. M. and Kennedy, A. R. 1991. Inhibition of N-nitrosomethylbenzylamine induced esophageal neoplasms by the Bowman-Birk protease inhibitor. *Carcinogenesis*. 12:2147~2150.
 8. Evans, S. M., Szuhaj, B. F., Van Winkle, T. and Kennedy, A. R. 1992. Protection against metastasis of radiation induced thymic lymphosarcoma and weight loss in C57B1/6NCr1BR mice by an autoclave resistant factor present in soybeans. *Radiat. Res.* 132:259~262.
 9. Kennedy, A. R., Beazer-Barclay, Y. and Kinzler, K. W. 1996. Suppression of carcinogenesis in the intestines of min mice by the soybean-derived Bowman-Birk protease inhibitor. *Cancer Res.* 56:679~682.
 10. Kennedy, A. R. 1995. The evidence for soybean products as cancer preventive agent. *J. Nutr.* 125:733~743.
 11. St. Clair, W., Billings, P., Carew, J., Keller-McGandy, C., and Kennedy, A. R. 1990. Suppression of DMH-induced carcinogenesis in mice by dietary addition of the Bowman-Birk protease inhibitor. *Cancer Res.* 50:580~586.
 12. Kennedy, A. R., Billings, P. C. and Newberne, P. 1993. Effects of various protease inhibitor preparations on oral carcinogenesis in hamsters induced by 7,12-dimethylbenzanthracene. *Nutr. Cancer.* 19:191~200.
 13. Liener, I. E. 1979. Protease inhibitors and lectins. *Int. Rev. Biochem.* 27:97~122.
 14. Hwang, D. L. R., Yang, W. K. and Foard, D. E. 1977. Purification, partial characterization and immunological relationships of multiple low molecular weight proteinase inhibitors of soybean. *Biochem. Biophys. Acta.* 495:369~382.
 15. 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.
 16. 八田一，長戸有希子，金武祚，1993。雞卵抗體(IgY)精製方法。農化。67:1422-1425。
 17. 杜艷櫻、陳昭誠、張鴻民，1998。雞蛋蛋黃中抗乳鐵蛋白抗體在免疫親和式膠體層析法精製牛乳初乳中乳鐵蛋白之應用。中華民國第二十八屆食品科技學會演講要旨。p.201。
 18. 杜艷櫻、陳昭誠、張鴻民 1999。雞蛋黃中抗豬血丙型球蛋白抗體 IgY 生成變化與純化。中華民國第二十九屆食品科技學會演講要旨。P.270。

附加圖表

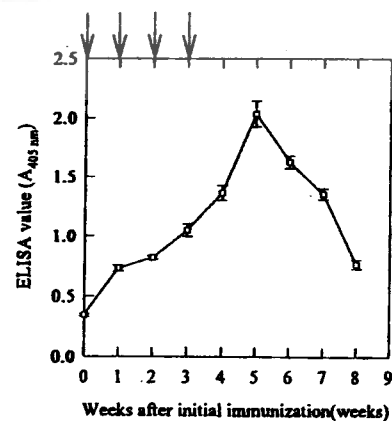


Figure 1. Changes in anti-BBI IgY antibody ELISA value of hen yolk during the immunization period. Hens were immunized with BBI once one week for 3 weeks after initial immunization. Arrows indicate the immunization schedule.

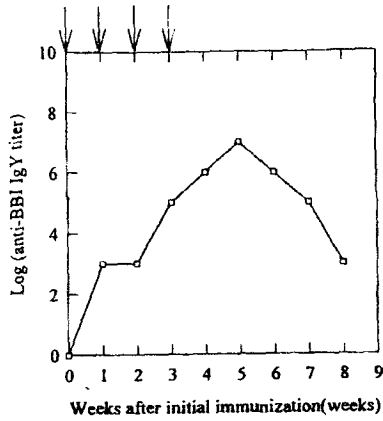


Figure 2. Changes in anti-BBI IgY titer of hen yolk during the immunization period. Hens were immunized with BBI once one week for 3 weeks after initial immunization. Arrows indicate the immunization schedule.

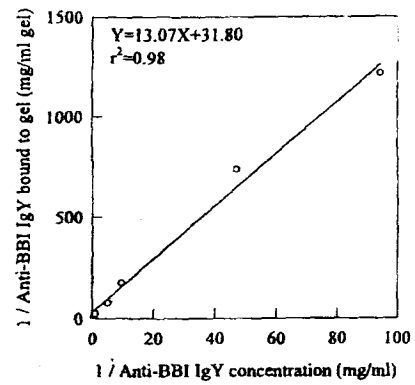
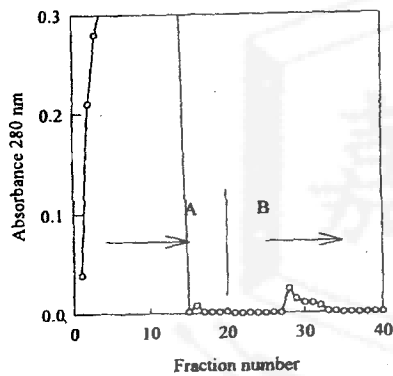


Figure 5. Lineweaver Burk line of BBI-Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity gel for anti-BBI IgY. Experimental conditions were the same as in Fig. 3.



A: 0.25 M NaCl/0.02 M phosphate-citrate (pH 7.2)
B: 0.5 M NaCl/0.1 M phosphate-citrate (pH 2.8)

Figure 3. Elution profile of anti-BBI IgY by BBI-Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity chromatography. Column size, 20 cm in length \times 1.0 cm in diameter; Sample, 5 ml crude IgY; Elution buffer, 0.5 M NaCl/0.1M phosphate-citrate buffer (pH 2.8); Flow rate, 0.2 ml/min; Fractionation, 2.0 ml/tube

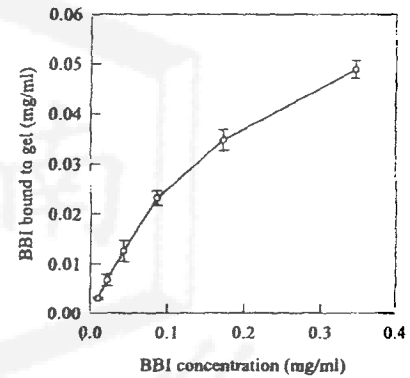


Figure 6. Apparent adsorption isotherm of anti-BBI IgY Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity gel for BBI. Experimental conditions were the same as in Fig. 3.

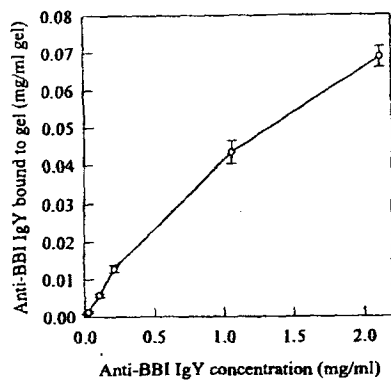


Figure 4. Apparent adsorption isotherm of BBI-Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity gel for anti-BBI IgY. Experimental conditions were the same as in Fig. 3.

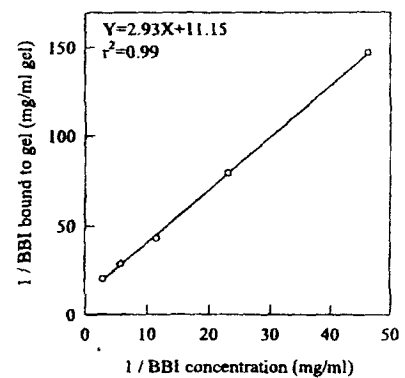


Figure 7. Lineweaver Burk line of anti-BBI IgY Sepharose 4 Fast Flow immunoaffinity gel for BBI. Experimental conditions were the same as in Fig. 3.