

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

免疫親和式層析分離具特異活性 IgY 之最適條件與方法

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2313-B-041-004-

執行期間：92年08月01日至93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

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 9 月 2 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

免疫親和式層析分離具特異活性 IgY 之最適條件與方法

Optimum dissociating condition for immunoaffinity chromatography and preferential isolation of IgY with high specific activity

計畫編號: NSC 92-2313-B-041-004

執行期限: 自民國 92 年 8 月 1 日起至民國 93 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

特異性抗體如蛋黃中的免疫球蛋白 (IgY), 逐漸廣泛應用在病毒感染的治療、特殊分子結構的偵測與鑑識、食品的分析檢測和複合物的結構與功能之判定。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。這是個純化抗體理想的方法, 然而在分離沖提階段仍然有許多需要改善的地方。有關免疫親和式層析系統的專一性及產能分別受到下列因素的影響: 抗體與抗原的親和性與專一性、solid matrix 的物理和化學性質、抗體與抗原之間的濃度比例和親和時的實驗條件。一般而言, 免疫親和式層析分離的效率與回收率, 必須在特異活性與產物總回收率之間尋求一個平衡。當採用較溫和的分離條件時, 可能生產高特異活性的抗體, 但是產能較低; 反之, 當採用較嚴厲的分離條件時, 可能提高產能, 但會因為抗體變性失活, 而導致低特異活性。理想的方式是能同時兼顧, 並能取得產能較高的特異活性的抗體。研究的結果為: 八種不同沖出液對特異性 IgY 之沖提能力較好前三種分別為 6.0 M guanidine hydrochloride、1.0 M NH₄OH 和 8. M urea, 其沖提能力均維持在 80% 以上, 其中 6.0 M guanidine hydrochloride 更可達到 90% 以上。依特異性 IgY 回收率 (recovery of specific IgY activity) 大小表示如下, 3.0 M MgCl₂ (70.2%) > 4.0 M MgCl₂ (50.8%) > 1.0 M NH₄OH (48.4%), 就此八種不同沖出液對特異性 IgY 之沖出且保留最多特異性 IgY

而言, 雖然 6.0 M guanidine hydrochloride、1.0 M NH₄OH 和 8. M urea 有很好的沖提能力, 但不若 pH 在中性條件的 3.0 M MgCl₂ (pH 7.2) 能保留最多特異性 IgY, 故從以上研究得知以 3.0 M MgCl₂ 做沖出液對特異性 IgY 之純化分離最合適。

關鍵詞: 免疫親和式層析、IgY、分離、特異活性

英文摘要

Specific antibodies, including immunoglobulins from egg yolk, have increasing applications in virus diagnosis, in detection and estimation of specific molecules, in food analysis and as an alternative approach in determination of structure and function of complex molecules. 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. Immunoaffinity procedures for isolating antibodies and/or antigens are highly efficient in terms of specificity and capacity. The limitations for this otherwise ideal process are generally centered about the dissociation stage. The specificity and capacity of immunoaffinity systems are generally dictated by the affinity and specificity of the antibody, the physical and chemical properties of the solid matrix, the concentration of the antigen/antibody, and the conditions in which immunoaffinity systems. In general, the efficiency of dissociation and recovery of immunoaffinity-bound ligands is

dependent on a balance between specific activity and total recovery of the product. A gentle dissociating condition may generate a product with high specific activity but low quantitative yield, while harsh dissociating condition may give high yield, but because of partial denaturation, low specific activity. We research the systematic comparison of 8 dissociating buffer in terms of anti-BBI IgY、anti-lysozyme IgY and anti-lactoperoxidase IgY specific activity and total quantitative yield. The eight dissociating buffer were chosen for their ability to perturb one or more of the physical forces responsible for the formation of immune complexes.

Keywords : Immunoaffinity chromatography、IgY、Isolation、Specific activity

二、緣由與目的

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。這是個純化抗體理想的方法,然而在分離沖提階段仍然有許多需要改善的地方。有關免疫親和式層析系統的專一性及產能分別受到下列因素的影響:抗體與抗原的親和性與專一性、solid matrix 的物理和化學性質、抗體與抗原之間的濃度比例和親和時的實驗條件。一般而言,免疫親和式層析分離的效率與回收率,必須在特異活性與產物總回收率之間尋求一個平衡。當採用較溫和的分離條件時,可能生產高特異活性的抗體,但是產能較低;反之,當採用較嚴厲的分離條件時,可能提高產能,但會因為抗體變性失活,而導致低特異活性。理想的方式是能同時兼顧,並能取得產能較高的特異活性的抗體。因此,本研究嘗試本研究的目的是:有系統比較常用的八種不同的分離緩衝液,對於 anti-BBI IgY、anti-lysozyme IgY 和 anti-lactoperoxidase IgY 此三種特異性 IgY 分離後之特異活性與總產能之變化;進一步評估其他作用力對抗體-抗原免疫複合物親和力之影響;另外比較當抗原限量時和抗原過量

時之抗體特異活性,尋求最適分離及量產之條件。

三、結果與討論

1.不同沖出液(elution buffer)在免疫親和式層析法之沖提能力

從圖一~圖三可看出八種沖出液(表一所示)對三種特異性 IgY (anti-BBI IgY、anti-lactoperoxidase IgY 和 anti-lysozyme IgY)免疫親和式層析膠體之沖提能力。圖一顯示八種沖出液對特異性 anti-BBI IgY 之沖提能力,依總蛋白質回收率(total protein recovery)大小表示如下, 6.0 M guanidine hydrochloride (90.2%) > 1.0 M NH₄OH (88.40 %) > 8. M urea (80.6%) > 3.0 M MgCl₂ (76.2%) > 0.1 M phosphate-citrate (74.52%) > 4.0 M MgCl₂ (72.6%) > 1.0 M Na₂CO₃ (62.8 %) > 0.5 M glycine (32.8%), 再比較圖二(anti-lactoperoxidase IgY)和圖三(anti-lysozyme IgY)之結果,得知在此八種不同沖出液對特異性 IgY 之沖提能力較好前三種分別為 6.0 M guanidine hydrochloride、1.0 M NH₄OH 和 8. M urea, 其沖提能力均維持在 80%以上,其中 6.0 M guanidine hydrochloride 更可達到 90%以上,顯示有很好的沖提能力。

2.不同沖出液對特異性 IgY 之安定性影響

從本人過去從事牛乳 IgG 和雞蛋黃 IgY 之安定性研究得知,當在強酸強鹼下牛乳 IgG 和雞蛋黃 IgY 很容易變性失活,尤其當 pH<4 或 pH>10 時更為顯著,由上得知雖然不同沖出液利用 pH 改變或鹽類離子強度對特異性 IgY 有不同的沖提能力,在追求良好的沖提能力下更要兼顧特異性 IgY 之安定性,以獲得更多有特異性活性的 IgY 為首要目標。

從圖四~圖六顯示八種沖出液對特異性 IgY 之安定性影響,依特異性 IgY 回收率(recovery of specific IgY activity)大小表示如下, 3.0 M MgCl₂ (70.2%) > 4.0 M MgCl₂ (50.8%) > 1.0 M NH₄OH (48.4%) > 6.0 M guanidine hydrochloride (27.1%) > 8. M urea (24.2%) > 0.1 M phosphate-citrate

(22.4%) > 1.0 M Na₂CO₃ (15.9 %) > 0.5 M glycine (10.2%) , 再比較圖五 (anti-lactoperoxidase IgY) 和圖六 (anti-lysozyme IgY) 之結果, 得知在此八種不同沖出液對特異性 IgY 之安定性較好前三種分別為 3.0 M MgCl₂、4.0 M MgCl₂ 和 1.0 M NH₄OH, 且有最好的特異性 IgY 回收率。

綜合以上圖一~圖六結果得知, 雖然 6.0 M guanidine hydrochloride、1.0 M NH₄OH 和 8. M urea, 顯示有很好的沖提能力。但是 6.0 M guanidine hydrochloride 和 8. M urea 容易使蛋白質變性失活, 同樣也容易使醣蛋白的特異性 IgY 失活, 而 1.0 M NH₄OH 的 pH 值高達 11.5 左右, 也容易使特異性特異性 IgY 變性失活。因此, 就此八種不同沖出液對特異性 IgY 之沖出且保留最多特異性 IgY 而言, 雖然 6.0 M guanidine hydrochloride、1.0 M NH₄OH 和 8. M urea 有很好的沖提能力, 但不若 pH 在中性條件的 3.0 M MgCl₂ (pH 7.2) 能保留最多特異性 IgY, 故從以上研究得知以 3.0 M MgCl₂ 做沖出液對特異性 IgY 之純化分離最合適。

3. 不同沖出液對抗體-抗原免疫複合物親和性之影響

以 pH 在中性條件的 3.0 M MgCl₂ (pH 7.2) 為沖出液對三種特異性 IgY (anti-BBI IgY、anti-lactoperoxidase IgY 和 anti-lysozyme IgY) 免疫親和式層析法求出膠體之最大吸附量(Q_{max})以進行評估比較, 如表二所示發現原先以 0.1 M phosphate-citrate buffer, 0.5 M NaCl (pH 2.8) 做為沖出液對三種特異性 IgY (anti-BBI IgY、anti-lactoperoxidase IgY 和 anti-lysozyme IgY), 得到最大吸附量分別為 0.032、0.074 和 0.68 mg/mL, 改以 3.0 M MgCl₂ (pH 7.2) 為沖出液後, 其最大吸附量明顯增加, 分別增加為 0.047、0.096 和 1.05 mg/mL, 顯示對於提高免疫親和式膠體最大吸附量及增加特異性 IgY 總產能均有顯著助益。

4. 特異性 IgY 之復性

由相關研究結果表三顯示, 改變 urea 濃度進行復性時, 隨 urea 濃度降低(8 M~ 1 M), 其中特異性 IgY 的活性有明顯增加, 由原先 24.2% (8 M) 逐漸升高至 47.3% (1 M), 表示在高濃度下易使 IgY 的立體構造受到影響, 進而影響其 Fab 與抗原結合的能力, 在較低濃度下顯示部份 IgY 有恢復原有之抗原-抗體之親合力, 因此, 應用免疫親和式層析後, 若使用高離子強度鹽類做為沖出液, 適當的透析去鹽可提升原有特異性 IgY 之活性。

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蛋品利用價值, 開發新產品, 以期提高附加價格, 其中雞蛋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蛋品, 對國人營養與健康是一大福音!

實驗研究工作整體而言完成 100%, 成果亦相當可觀, 從以上研究得知以 3.0 M MgCl₂ 做沖出液對特異性 IgY 之純化分離最合適。同時顯示對於提高免疫親和式膠體最大吸附量及增加特異性 IgY 總產能均有顯著助益。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

- 大竹繁雄、平澤正知、津田 憲, 1993。雞卵抗體 口疾患消化管感染予防止利用。農化 67: 437-1439。
- 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。
- 矢澤 伸, 1993。血液型糖鎖抗原對雞卵抗體作製利用。農化 67: 1433-1436。
- Akita, E.M. and Naki, S. 1992. Immunoglobulins from egg yolk isolation and purification. J. Food Sci. 57: 629-633.
- Akita, E.M. and Naki, S. 1993. Comparison of four purification methods for the production of Immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an

- enterotoxigenic *E. coli* strain. *J. Immunol. Methods* 160 : 207-214.
- Bade, H. and Stegemann, H. 1984. Rapid method of extraction of antibodies from hen egg yolk. *J. Immunol. Methods* 72 : 421-426.
- Burley, R. W. and Vadehra, D. V. 1979. Chromatographic separation of the soluble proteins of hen's egg yolk: an analytical and preparative study. *Anal. Biochem.* 94:53-59.
- 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.
- Chang, H. M., Ou-Yang, R. F., Chen, Y. T. and Chen, C. C. 1999. Productivity and some properties of immunoglobulin specific against *Streptococcus mutans* serotype c in chicken egg yolk (IgY). *J. Agri. Food Chem.* 47(1): 61-66.
- 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. Chen, C. C. and Chang, H. M. 1998. Effect of thermal protectants on the stability of bovine milk immunoglobulin G. *J. Agri. Food Chem.* 46(9): 3570-3576.
- Fichtali, J., Charter, E. A., Lo, K.V. and Nakai, S. 1993. Purification of antibodies from industrially separated egg yolk. *J. Food. Sci.* 32 : 52-56.
- Fukumoto, L. R., Skura, B. J. and Nakai, S. 1994. Stability of membrane-sterilized bovine immunoglobulins aseptically added to UHT milk. *J. Food Sci.* 59 : 757- 759,762.
- Hatta, H., Kim, M., and Yamamoto, T. 1990. A novel isolation method for hen egg yolk antibody. *Agric. Biol. Chem.* 54 : 2531-2535.
- Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M. and Yamamoto, T. 1993. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57 : 450-454.
- Horikoshi, T., Hiraoka, J., Saito, M. and Hamada, S. 1993. IgG antibody from hen yolks : purification by ethanol fraction. *J. Food Sci.* 58 : 739-742,779.
- Kim, H. and Nakai S. 1998. Immunoglobulin separation from egg yolk : a serial filtration system. *J. Food Sci.* 61 : 510-512, 523.
- Kronvall, G., Seal, U. S., Finstad, J. and JR.. R. C. W. 1970. Phylogenetic insight into evolution of mammalian Fc fragement of -globulin using Staphylococcal protein A. *J. Immunol.* 104 : 140-147.
- McCannel, A. A. and Nakai, S. 1990. Separation of egg yolk immunoglobulins to subpopulations using DEAE-ion exchange chromatography. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 23 : 42-46.
- McNulty, M. S., Allan, G. M. and Stuart, J. C. 1978. Rotavirus infection in avian species. *Vet. Rec.* 103 : 319-320.
- Ntakarutimana, V., Demedts, P., Sande, M. V. and Scharp'e, S.1992. A simple and economical strategy for downstream processing of specific antibodies to human transferrin from yolk. *J. Immunol. Methods* 153 : 133-140.
- 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.
- Polson, A., Coetzer, T., Kruger, J., Maltzahn, E. V. and Merwe K. J. Vander 1985. Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunol. Invest.* 14 : 323-327.
- 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:
- Tu, Y. Y. Chen, C. C., and Chang, H. M. 2001. Isolation of immunoglobulin in yolk (IgY) and rabbit serum immunoglobulin G (IgG) specific against bovine lactoferrin by immunoaffinity chromatography. *Food Research International.* Accepted.

附加圖表