

卵黄免疫球蛋白的提取及其体外抑菌作用的研究

张志强, 李志涛

(衡水学院 生命科学学院, 河北 衡水 053000)

摘要: 对卵黄免疫球蛋白(IgY)的提取工艺及其抑菌作用进行研究。采用水稀释法脱除卵黄中的脂类, 确定最佳除脂条件为: 水稀释倍数 6 倍; 采用硫酸钠盐析法与凝胶层析法对卵黄进一步纯化, 得到纯度为 97% 的 IgY。用不同质量浓度的 IgY 对大肠杆菌进行抑菌试验, 发现高质量浓度 IgY 的抑菌效果要优于低质量浓度的抑菌效果, 以 10 g/L 的抑菌率最高, 为 74.3%。

关键词: 卵黄免疫球蛋白; 抑菌活性; 水稀释法

中图分类号: S852.4 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)10-0152-03

Extraction, Purification and Antibacterial Activity of Immunoglobulin in Yolk

ZHANG Zhi-qiang, LI Zhi-tao

(College of Life Sciences, Hengshui University, Hengshui 053000, China)

Abstract: The extraction process and antibacterial activity of IgY were studied in this paper. The parameters of water dilution method were optimized to remove the lipids from egg yolk. The results showed that the optimal water dilution was 6 folds. A procedure was developed for the purification of IgY antibody from hen yolks by sodium sulfate precipitation and gel chromatography and the purity of IgY was 97%. Tests on antibacterial activity of IgY showed that the antibacterial effects of higher concentrations of IgY were better than those of lower concentrations.

Key words: immunoglobulin in yolk; antibacterial activity; water dilution method

鸡蛋是人经常食用的食物之一, 鸡蛋中含有人体所必须的多种氨基酸, 对人体的组织修复和新陈代谢起着不可或缺的作用。长期以来, 人们都把目光放在鸡蛋的营养功能上, 而对鸡蛋的免疫功能了解甚少。卵黄免疫球蛋白(immunoglobulin in yolk, IgY)是鸡卵黄中存在的主要免疫球蛋白之一。其形成的主要原理为: 当用某种抗原物质免疫母鸡时, 母鸡就会自动产生免疫反应, 血液中的免疫球蛋白(IgG)就会增多, 在卵黄成熟期, 血液中的 IgG 选择性地转移到卵黄中, 形成 IgY^[1]。当前, 免疫球蛋白主要来源于哺乳动物的血清, 这种来源限制了免疫球蛋白的大规模生产。与哺乳动物血液中提取免疫球蛋白相比, 鸡蛋中提取的 IgY 具有独特的优势: (1)产量高, 一枚鸡蛋含有 IgY 100~250 mg^[2],

这相当于从一只 2~3 周的家兔身上所提取的抗体量^[3]; (2)IgY 不与血清中的类风湿因子结合^[4]; (3)不激活哺乳动物补体系统^[5]; (4)不与 Fc 受体结合, 可避免在免疫检验过程中产生假阴性或假阳性结果^[6-7]; (5)性质稳定, 温度低于 75 °C, pH 值 4.0~12.0 的条件下, IgY 活性几乎不受影响; (6)可以避免对动物的伤害。

国外对 IgY 的研究较早。早在 1980 年, Polson 等^[8]就以植物病毒免疫母鸡, 获得较高抗体纯度的特异性 IgY; 1988 年, Robert 等^[9]用卵黄及其提取物成功抑制了组织细胞培养轮状病毒生长。国内对 IgY 的研究始于 20 世纪末。1997 年, 江西中德联合研究院的龙中儿等^[10]用婴幼儿轮状病毒抗原免疫产卵母鸡, 成功制备出安全无毒的抗婴幼儿轮状

收稿日期: 2012-05-06

基金项目: 衡水学院院级课题(2010038)

作者简介: 张志强(1983-), 男, 河北衡水人, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术与微生物。E-mail: 435395363@qq.com

病毒的 IgY。吴媛媛等^[11]利用免疫亲和层析的方法对氯霉素的特异性 IgY 进行了纯化,最终计算得到特异性 IgY 占总提取蛋白的 3.3%。

IgY 独特的性质使其在食品工业、临床医学、饲料工业、保健品行业具有广泛应用。目前,IgY 提取纯化方法主要有以下几种:水稀释法、聚乙二醇法、葡聚糖硫酸盐法、黄原胶法、冷乙醇分级分离法和超滤法^[12],但是每种方法都有其局限性,因此,寻找能够大量获得安全性高、廉价易得的 IgY 来源成为关注的焦点。本研究利用水稀释法结合硫酸钠盐析法成功纯化得到高纯度的 IgY,并研究了 IgY 对大肠杆菌抑菌效果,为 IgY 的大规模生产和应用提供了技术支持。

1 材料和方法

1.1 试验材料

鸡蛋为经抗原免疫后的京白蛋鸡所产,效价稳定;人源致病性大肠杆菌由衡水学院生命科学学院保存;其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

IgY 抗体的提取步骤为脱脂、硫酸钠盐析、凝胶层析。

1.2.1 脱脂条件的优化 由于卵黄中的脂肪含量高达 30.5%,并且大部分蛋白与脂肪结合形成脂蛋白^[13],因此,要想获取高纯度 IgY,必须去除卵黄中的脂肪。本试验采用水稀释法对脂肪进行去除。水稀释法主要研究稀释倍数对除脂率的影响及其条件优化。稀释倍数对除脂率的影响:取 8 份卵黄溶液,每份卵黄溶液 5 mL,调 pH 值为 5.0,然后用蒸馏水分别稀释 2~9 倍,将稀释后的溶液置于 -20℃ 下放置过夜,室温解冻,4℃、10 000 g 条件下离心 10 min,取上清液测定其脂肪含量,确定最佳除脂的稀释倍数。优化脱脂后得到卵黄水溶性组分(WSF)。脂肪含量测定采用氯仿-甲醇法^[14]。

1.2.2 盐析法制备 IgY 为了得到高纯度的抗体 IgY,采用硫酸钠沉淀法^[15]对脱脂后的 WSF 进一步纯化。方法为:取 WSF 组分 20 mL,加入饱和硫酸钠溶液至硫酸钠最终体积分数为 19%,4℃、10 000 g 条件下离心 30 min,取沉淀。利用 20 mL 蒸馏水将沉淀溶解,并向溶液中加入饱和硫酸钠溶液至硫酸钠最终体积分数为 14%,再次离心后,利用 20 mL 蒸馏水溶解沉淀。

1.2.3 凝胶层析 采用 Superdex 200 10/60 凝胶柱进一步纯化目标蛋白 IgY,洗脱液为 pH 值 7.4、

10 mmol/L 的 PBS 溶液。同时对盐析后得到的卵黄溶液脱盐。利用快速蛋白液相系统对 WSF 组分、硫酸钠沉淀获得 IgY 样品和凝胶层析后获得的 IgY 样品进行纯度检测。

1.3 IgY 抗体蛋白含量的测定

IgY 抗体蛋白含量采用 Bradford 法测定^[16],以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.4 IgY 抗体抑菌试验

取 3 mL(菌体密度为 10^6 cfu/mL)活化后的大肠杆菌,加入到 3 支营养肉液体培养基的试管中,每个试管加入 1 mL 的菌体。然后向其中 2 支试管中各加入 1 mL 不同质量浓度的 IgY 抗体,使抗体的终质量浓度分别为 1 g/L 和 10 g/L;向另一支试管中加入 1 mL 无菌水作为对照。将 3 支试管于 37℃ 下培养 6 h 后,取 1 mL 培养液,用稀释平板法计算抑菌率。每个试验均设 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 除脂条件优化结果

由图 1 可以看出,随着稀释倍数的增加,除脂率快速增加,上清液的澄清程度也快速增加。当稀释倍数为 6 倍时,除脂率达到 99.69%。当稀释倍数继续增大,除脂率没有太大的变化,因此,确定最佳除脂的稀释倍数为 6 倍。

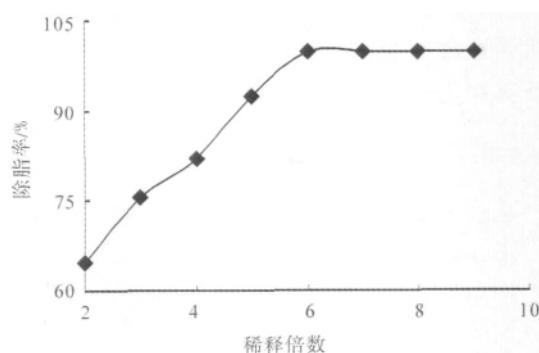


图1 不同稀释倍数对除脂率的影响

2.2 IgY 的提取纯化结果

对去除脂肪后得到的 WSF 组分进行纯化,纯化方法主要采用硫酸钠盐析法和凝胶层析法。卵黄水溶性组分中含有血清白蛋白、 α 糖蛋白、IgY 等多种蛋白组分,因此,卵黄中的蛋白含量较高,IgY 的纯度较低。由表 1 可知,经过硫酸钠分步盐析后,去除掉卵黄中较多的杂蛋白,蛋白含量降至 2.85 g/L,IgY 纯度大幅提高至 87%。经过凝胶层析后,杂蛋白的含量进一步减少,IgY 纯度提高为 97%。经过纯化后的 IgY 效价提高了 2 倍。

表 1 分离纯化过程中抗体的回收情况

方法	蛋白含量/(g/L)	纯度/%
水稀释法	12.10	25
硫酸钠盐析	2.85	87
凝胶层析	1.90	97

2.2 IgY 的抑菌率

在 3 支试管内加入密度为 10^6 cfu/mL 大肠杆菌培养液,然后加入纯化后的 IgY,使 IgY 的质量浓度分别为 0 g/L、1 g/L 和 10 g/L。将试管置于 37 °C 条件下培养 5 h,从各试管中取样 1 mL,作系列稀释后计算菌落数目。结果表明,抗原免疫后的 IgY 能有效抑制大肠杆菌的生长。其中 1 g/L 的纯化 IgY 对大肠杆菌的抑制率为 38.7%,10 g/L 的 IgY 对大肠杆菌的抑制率为 74.3%,10 g/L 的 IgY 抑菌效果明显比 1 g/L 的抑菌效果好,因此,在本试验中,高质量浓度的 IgY 抑菌效果要优于低质量浓度的抑菌效果。

3 讨论

本试验采用水稀释法结合硫酸钠盐析对卵黄免疫球蛋白进行分离纯化,成功分离到高纯度的 IgY (97%)。这与以前分离纯化 IgY 的方法相比,具有方法简单、操作步骤少、成本低等优点。利用 1 g/L 和 10 g/L 的 IgY 对大肠杆菌进行抑菌研究,结果显示,高质量浓度的 IgY 对大肠杆菌的抑制率要优于低质量浓度的抑制率。这为 IgY 的大规模分离纯化及其在免疫学中的应用提供了理论基础。

参考文献:

- [1] 杨娟. 卵黄免疫球蛋白的分离纯化研究[D]. 东营: 中国石油大学, 2009.
- [2] Carroll S B, Stollar B D. Antibodies to calf thymus RNA polymerase II from egg yolk of immunized hens [J]. J Biol Chem, 1983, 258(1): 24-26.
- [3] Larsson A, Balow R, Lindahl T L, et al. Chicken antibodies: taking advantage of evolution—a review [J]. J Poult Sci, 1993, 72(10): 1807-1812.
- [4] Larsson A, Karlsson-Parra A, Sjoquist J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors[J]. Clin Chem, 1991, 37(3): 411-414.
- [5] Larsson A, Wejaker P E, Forsberg P O, et al. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA[J]. J Immunol Methods, 1992, 156(1): 79-83.
- [6] Benson H N, Brumfield H P, Pomeroy B S. Requirement of avian C'1 for fixation of guinea pig complement by avian antibody-antigen complexes[J]. J Immunol, 1961, 87: 616-622.
- [7] Davalos-Pantoja L, Ortega-Vinuesa J L, Bastos-Gonzalez D, et al. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2000, 11(6): 657-673.
- [8] Polson A, von Wechmar M B, van Regenmortel M H V. Isolation of viral IgY antibodies from egg yolks of immunized hens [J]. Immunological Communication, 1980, 9(5): 475-493.
- [9] Robert H. Antibodies to rotaviruses in children's eggs: a potential source of antiviral immunoglobulin suitable for human consumption[J]. Pediatrics, 1988, 81: 291.
- [10] 龙中儿, 钟青萍, 朱跃科, 等. 鉴抗轮状病毒卵黄免疫球蛋白的蛋白酶水解及被动免疫保护作用[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1997, 11(4): 358-362.
- [11] 吴媛媛, 包永明, 李晓晖, 等. 抗氯霉素卵黄抗体的制备及其分离纯化[J]. 过程工程学报, 2006, 6(2): 281-284.
- [12] 王彩凤. 鸡卵黄免疫球蛋白的提取及生物活性的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2003.
- [13] Harry W, Harold B. Preparation of lipid-free protein extracts of egg yolk [J]. Analytical Biochemistry, 1978, 91: 75-81.
- [14] 谢燕, 章超桦, 刘书成, 等. 南海 8 种低值小杂鱼脂肪含量和脂肪酸组成分析[J]. 南方水产, 2007, 3(3): 47-52.
- [15] Amaral J A, Tino De Franco M, Carneiro-Sampaio M M, et al. Anti-enteropathogenic *Escherichia coli* immunoglobulin Y isolated from eggs laid by immunized Leghorn chickens[J]. Res Vet Sci, 2002, 72(3): 229-234.
- [16] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.