

提纯鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 方法的研究*

谢国文, 张永宏**, 许春杏, 杨杰, 张维森, 张健

(贵阳医学院附院 消化科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 优化抗幽门螺杆菌蛋黄免疫球蛋白 IgY 提取方法。方法: 比较硫酸铵盐和饱和硫酸铵 2 种方法对卵黄除脂效果的影响, 并采用 SDS-PAGE 对提取产物进行鉴定。结果: pH5.1 水稀释法加盐析法(两步硫酸铵法)除脂效果相对较好, 获得 IgY 纯度及得率均较高。结论: 水溶稀释法加盐析法(两步硫酸铵法)制备 IgY 具有纯度高、得率高、特异性强及利用小体积样品获得大量纯化蛋白的优点。

[关键词] 免疫球蛋白类; 蛋黄蛋白质类; 鸡

[中图分类号] R341.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1000-2707(2012)02-0211-02

近年来, 将含有特异性 IgY 的免疫鸡蛋口服用于防治轮状病毒腹泻、脊髓灰质炎、甲型肝炎和其它肠道感染性疾病并取得满意效果^[1], 亦有口服特异性 IgY 鸡蛋产品替代抗生素成功治疗胃肠道疾病的报道^[2]。鸡卵黄抗体 (Immunoglobulin of egg yolk, IgY) 是由母鸡血液中 IgG 转移至其卵黄中对子代产生保护性作用的免疫球蛋白^[3]。免疫鸡蛋黄中含有大量来源于血清的 IgG 抗体 (即 IgY), 浓度远高于血清, 维持时间长达 28 周, 具有高度稳定性和生物学活性, 这使鸡卵黄抗体 IgY 口服防病治病成为可能, 目前国内外已有较多关于怎样从鸡蛋黄中提取 IgY 的报道^[4,5], 但存在诸如实验步骤繁琐不易操作、IgY 提取的纯度与得率均较低等缺点。本实验意在寻求一种相对简单、实用、纯度与得率均较高的提取鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 方法, 为大规模制备口服抗幽门螺旋杆菌 IgY 抗体治疗胃肠道疾病实验提供资料。

1 材料与方 法

1.1 动物与试剂

罗曼母鸡由重庆医科大学动物中心提供; SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 P0012A、蛋白分子量标准 P0061、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5X)、SDS-PAGE 电泳液 P0014B、考马斯亮蓝染色液 (常规法) P0017B、考马斯亮蓝脱色液 (常规法) P0017C、PBS、硫酸铵、EDTA 均由碧云天生物技术研究所

提供。

1.2 IgY 提取与纯化

1.2.1 两步硫酸铵提取方法 取消毒完毕的鸡蛋 1 个, 用剪刀打开一个小洞, 让蛋清缓缓流出至不能再流出后, 再以无菌生理盐水洗净卵清, 将整个卵黄小心移至滤纸上, 来回滚动, 除尽蛋清。再用针头刺破蛋黄, 使之移到量筒。量取约 8 ml 蛋黄液, 加 10 倍双蒸水稀释卵黄, 混匀后调 pH 值为 5.1, -20 °C 过夜, 室温解冻, 12 000 r/min 4 °C 离心 30 min, 再将上清液用滤纸过滤除脂, 获得较清上清液。上清液加入硫酸铵晶体, 使其浓度为 19%, 静置 1 h 后, 再次以 12 000 r/min 4 °C 离心 15 min, 取其白色沉淀。将白色沉淀溶于 15 ml 0.01 mol/L pH 7.4 PBS 中, 再加入硫酸铵晶体, 使其浓度为 14%, 再次静置 1 h 后, 再次以 12 000 r/min 4 °C 离心 15 min, 取其白色沉淀, 溶于 0.01 mol/L pH7.4 的 PBS 2 ml 中。置于双蒸水中搅拌透析, 1 h 后更换透析液一次, 共 4~5 次, 透析过夜后, 析出透析后的样品, 再以 0.22 μm 滤器过滤灭菌。获得 IgY 后用无菌 EP 管盛装, 置 -20 °C 保存^[6]。

1.2.2 透析袋处理 在 300 ml 透析处理液 (2% NaHCO₃、1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 中将透析袋煮沸 10 min 后, 以蒸馏水彻底漂洗后再在 300 ml (pH 8) 1 mmol/L EDTA 液中煮沸 10 min, 再以灭菌水里外彻底冲洗。

1.2.3 饱和硫酸铵提取方法 以相同浓度卵黄粗提液进行饱和硫酸铵提取。用水稀释法粗提卵黄

* [基金项目] 贵州省科基金 黔科合 J 字 (2005)2121 号

** 通讯作者 E-mail: zyh20103026@163.com; 936570026@qq.com

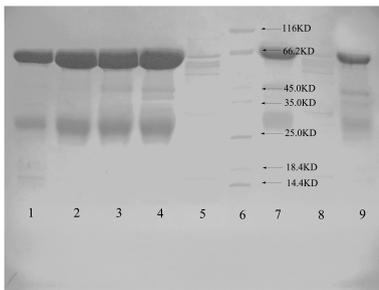
获得上清液后(方法同两步硫酸铵法),加入饱和硫酸铵(pH 6.0~7.0),使硫酸铵浓度为 50%,静置 2 h,以 12 000 r/min 4 ℃ 离心 15 min 离心弃上清液,加入饱和硫酸铵至 33% 饱和度,静置 2 h 再次以 12 000 r/min 4 ℃ 离心 15 min,离心取沉淀。如此重复 2、3 次可获 IgY。其后实验过程同两步硫酸铵法,同样将获得的 IgY 用无菌 EP 管盛装,置 -20 ℃ 保存。

1.3 SDS-PAGE 电泳

根据目标蛋白的分子量大小选择合适的凝胶浓度,再按照 SDS-PAGE 电泳说明书及参考文献资料方法进行配胶、电泳、染色与脱色。

2 结果

两步硫酸铵法提纯的 IgY 纯度与得率均高于饱和硫酸铵法,用 BandScan 软件分析蛋白纯度,前者所得的 IgY 纯度可达 90% 以上,而后者所得的 IgY 纯度约为 72%。用 Bradford 方法测定 IgY 蛋白浓度,前者蛋白得率为 6.25 g/L 蛋黄,后者蛋白得率仅为 4.25 g/L 蛋黄。显然两步硫酸铵法提取的 IgY 纯度与得率均高于后者。



注:1-4 泳道为两步硫酸铵法提取的 IgY,5、8 泳道为超声超碎的 HP 抗原,6 泳道为 Marker,7、9 泳道为饱和硫酸铵法提取的 IgY。

图 1 两步硫酸铵法与饱和硫酸铵提纯的 IgY 电泳图

Fig.1 Comparison of electrophoregrams of IgY purified with two step ammonium sulfate method and saturated ammonium sulfate

3 讨论

近年来随着科学技术的飞速发展,从鸡蛋黄中

提取免疫球蛋白卵黄抗体技术(IgY 技术)正在成为生物技术领域和医药研究中的新热点,并且越来越得到国内外同仁的重视,有可能替代用免疫动物提取血清免疫球蛋白治疗与预防疾病的方法^[7]。

本实验比较了两步硫酸铵法与饱和硫酸铵法提取卵黄抗体 IgY 技术。实验结果显示,两步硫酸铵法所得的 IgY 纯度与得率均高于饱和硫酸铵法,前者与后者相比,具有优越性。

从免疫鸡蛋中用两步硫酸铵法获取抗体的方法简单而又实用,提取鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 纯度与得率均相对较高^[8]。期待卵黄抗体 IgY 技术日趋成熟,使得大规模生产鸡卵黄免疫球蛋白 IgY 并在预防和治疗细菌和病毒引起的消化道和非消化道疾病中发挥重要作用成为可能^[8]。

4 参考文献

- [1] 郑平,孙先军,郭宇红,等.抗轮状病毒免疫球蛋白治疗婴幼儿轮状病毒肠炎疗效观察[J].中国妇幼保健,2007(29):4108-4109.
- [2] 黄清松,罗深秋.抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)卵黄免疫球蛋白(IgY)的制备与性质研究[J].广东药学院学报,2008(2):11-14.
- [3] 陈斌,杨志华.鸡卵黄免疫球蛋白(IgY)的作用机理及应用前景[J].浙江畜牧兽医,2005(1):9-10.
- [4] 扬帆,张连峰.卵黄抗体的分离提取和纯化方法[J].中国比较医学杂志,2007(11):7-11.
- [5] Dong D, Liu H, Xiao Q, et al. Affinity purification of egg yolk immunoglobulins(IgY) with a stable synthetic ligand[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008(870):51-54.
- [6] Nilsson E, Larsson A, Olesen H V, et al. Good effect of IgY against Pseudomonas aeruginosa infections in cystic fibrosis patients[J]. Pediatr Pulmonol, 2008(9):892-899.
- [7] Greunke K, Spillner E, Braren I, et al. Bivalent monoclonal IgY antibody formats by conversion of recombinant antibody fragments[J]. J. Biotechnol, 2006(2):446-456.
- [8] 郑平,孙先军,郭宇红,等.抗轮状病毒免疫球蛋白治疗婴幼儿轮状病毒肠炎疗效观察[J].中国妇幼保健,2007(29):4108-4109.

(2011-12-27 收稿,2012-02-27 修回)

编辑:余 堃