

文章编号:1673-1689(2007)02-0030-04

盐析法提取卵黄免疫球蛋白的研究

冷春玲

(辽东学院 农业与环境学院生物系, 辽宁 丹东 118003)

摘要: 为了确定盐析法提取特异性卵黄免疫球蛋白的最佳盐浓度, 采用 SDS-PAGE 鉴定 IgY 的纯度, 用 RID 测定 IgY 含量, 间接 ELISA 法检测特异性卵黄抗体的活性。结果表明: 用饱和度和 50% 的硫酸铵盐析一次, 再用 140 g/L 的硫酸钠溶液盐析, 可以获得 46% 的回收率和 77% 的纯度。盐析液经超滤膜包超滤后制得的冷冻干燥制品, 保持了完整的抗体结构和良好的抗体活性。这一结果为 IgY 的进一步分离纯化奠定了基础。

关键词: 盐析; 卵黄抗体; 纯度; 活性; 回收率

中图分类号: Q 512.2

文献标识码: A

Improved Method for Purification of IgY from Yolk by a Two-Step Procedure Using Salt Precipitation

LENG Chun-ling

(College of Agriculture and Environment, Liaodong University, Dandong 118003, China)

Abstract: In this manuscript, the optimal salt concentration for IgY purification by two-step procedure using salt precipitation was determined. The optimum IgY recovery (46%) and purity (77%) were achieved by precipitation with 50% saturation ammonium sulfate followed by precipitating with 14% sodium sulfate.

Key words: salt precipitation; IgY; activity; purity; recovery

卵黄免疫球蛋白(egg yolk immunoglobulin, IgY)亦称卵黄抗体,是母鸡在卵的发育过程中,由血清中的 IgG 有效转移至卵黄而成^[1]。与哺乳动物的 IgG 相比, IgY 具有价廉易得、稳定性较好、可口服等优点,在疾病的免疫检测和防治方面具有良好的应用前景^[2]。然而 IgY 还未作为理想产品得到广泛应用,部分原因在于从卵黄中分离 IgY 存在工艺方面的困难。IgY 的分离主要包括卵黄中水溶性组分(Water Soluble Fraction, WSF)的分离和

WSF 中特异性 IgY 的分离两步。近年来的研究表明,水稀释法是一种简便、高效、经济的方法。该方法通常是在制备 WSF 后,用适当的无机盐反复进行提取,获得较高回收率和纯度的 IgY,再经各种色谱纯化,便可获得电泳级 IgY^[3]。运用盐析法分离纯化特异性 IgY 的过程中,盐浓度对特异性 IgY 的回收率和纯度具有很大的影响。作者在现有方法的基础上,探讨了两步盐析提取 IgY 的最佳条件,为进一步大规模分离纯化特异性 IgY 提供依据。

收稿日期: 2006-04-06.

基金项目: 辽宁省博士科研启动基金项目(2004-1087),丹东市科技计划项目(06112).

作者简介: 冷春玲(1965-),女,辽宁丹东人,副教授,理学学士,主要从事生物技术研究. Email: chunlingleng@163.com

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 鸡蛋 抗产肠毒素大肠杆菌 k88 菌毛的特异性鸡蛋。

1.1.2 主要试剂及仪器 弗氏佐剂、兔抗鸡 IgG、兔抗鸡 IgG-HRP: 购自美国 Sigma 公司; 标准鸡 IgY: 购自美国 Promega 公司; 蛋白 Marker: 购自美国 Amersham 公司; 超滤膜包(100): 购自德国 Sartorius 公司; 0.22 μm 滤膜(D 50 mm): 购自大连依利特分析仪器有限公司; 其它试剂均为国产分析纯产品。紫外-可见分光光度计: 日本 JASCO 公司产品; SUNRISE 酶标检测仪: 澳大利亚 TECAN 公司产品; 冷冻干燥仪: 日本大川原株式会社产品; 低温冷冻离心机: 德国 Eppendorf 公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 WSF 的分离 参照 Akita 等^[3]的方法, 用清水洗净鸡蛋, 再用质量分数 0.5% 新洁尔灭溶液浸泡 20 min, 晾干。用卵黄分离器分离卵黄, 去除卵清蛋白和卵黄膜, 收集卵黄, 加 6 倍于卵黄体积的蒸馏水, 用 0.1 mol/L 盐酸调 pH 值至 5.0, 搅匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜, 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 r/min 离心 25 min, 取上清液, 经直径 0.45 μm 滤膜过滤, 收集的滤液即为 WSF。

1.2.2 IgY 的提取 在 WSF 中缓慢加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至不同饱和度, 混匀, 待完全溶解后置 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 用去离子水重新悬浮沉淀至原体积, 再加入不同质量浓度的 Na_2SO_4 混匀, 置室温过夜。25 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 用去离子水重新悬浮沉淀至原体积, 即为 IgY 的提取液。

1.2.3 IgY 含量测定 参照 Akita 等^[4]的方法, 用 pH 7.4 的 PBS(0.01 mol/L, 含 0.02% NaN_3) 配制质量分数 1% 琼脂糖凝胶, 沸水浴溶化后加入质量分数 3% 的兔抗鸡 IgG 抗血清(抗血清稀释 5 倍), 倒入培养皿中, 待凝固后打孔, 孔径为 3 mm。将稀释一定梯度(0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g/L)的标准鸡 IgY 和稀释适当倍数的待测样品分别加入小孔中, 每孔 6 μL , 置于湿盒内, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 测沉淀环直径。重复 3 次所得平均值, 以标准鸡 IgY 沉淀环直径对 IgY 质量浓度的对数作标准曲线, 从标准曲线中查得待测样品的 IgY 浓度。

1.2.4 IgY 回收率及纯度测定 以牛血清白蛋白为标准蛋白质, 用考马斯亮兰法测蛋白质浓度。采用 SDS-PAGE 检测蛋白质纯度, 非还原条件下为

4.0%~7.5% 梯度凝胶, 还原条件下为 4%~15% 梯度凝胶。利用 Lab-Image 软件根据 SDS-PAGE 电泳图分析推算出盐析产物(沉淀)中 IgY 的纯度。

$$R_{\text{抗体}} = \frac{\text{待测样品中 IgY 质量分数}}{\text{WSF 中 IgY 质量分数}}$$

$$P_{\text{抗体}} = \frac{\text{待测样品中 IgY 质量分数}}{\text{待测样品蛋白质质量分数}}$$

1.2.5 IgY 活性检测 参照 Jin 等^[5]的方法, 将菌毛蛋白用碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释成 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。每孔加 100 μL 包被 96 孔酶标板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。用洗涤液(pH 7.4 PBS, 质量分数 0.05% tween20)洗涤酶标板 3 次, 每孔加 100 μL 1% BSA 封闭, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h 后甩干、洗涤 3 次, 加待测样品 100 μL (样品中 IgY 质量浓度均为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。同时加入阴性对照、阳性对照和空白对照, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h; 反应结束, 用洗涤液洗酶标板各孔 3 次, 再向各孔加兔抗鸡 IgG-HRP 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h; 洗涤液洗涤各孔 5 次, 每孔加 100 μL TMB 底物溶液, 室温下显色 20 min, 每孔加 50 μL 2 mol/L 硫酸终止反应, 用酶标仪测 $A_{450/630}$ 。

2 结果与讨论

2.1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析条件的优化

取水稀释法粗提的 IgY, 分别于 25%~80% 的不同饱和度的硫酸铵盐析后, 经 SDS-PAGE 电泳, Lab-Image 软件分析推算盐析产物中 IgY 的纯度, 根据免疫扩散结果分析推断盐析产物中 IgY 的回收率。实验结果见表 1。

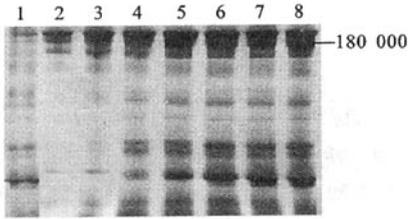
表 1 IgY 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析

Tab. 1 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitate of IgY

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 饱和度/%	沉淀	
	回收率/%	纯度/%
25	0	21.9
30	45.15	66.5
40	87.9	61.9
50	91.3	35.6
60	92.6	34.0
70	92.8	23.6
80	93.15	23.6

由 SDS-PAGE 电泳结果可见(图 1), 随着硫酸铵饱和度从 25%~80% 的一系列梯度增加, IgY 的溶解度迅速降低, 在低于 40% 饱和度时, 大部分杂蛋白残留于盐析上清液中。随着硫酸铵饱和度的不断增加, 愈来愈多的杂蛋白由可溶性状态转为沉

淀析出,从而影响了盐析产品的 IgY 纯度。当硫酸铵饱和度达 50% 时,大部分 IgY 从可溶性状态转变为沉淀析出。



1. 25%; 2. 30%; 3. 40%; 4. 45%; 5. 50%; 6. 60%; 7. 70%; 8. 80%

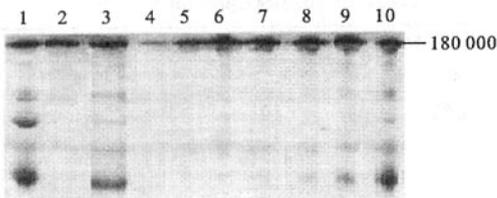
图1 不同饱和度 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 提取 IgY 的 SDS-PAGE 图

Fig. 1 SDS-PAGE (non-reducing) pattern on 7.5% gel of IgY purified by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation of different percentage saturation

实验结果表明,随着硫酸铵溶液饱和度进一步提高,析出的杂蛋白量不断增加,产品的抗体纯度反而逐渐下降。盐析分离 IgY 时,硫酸铵盐析的最佳饱和度为 50%。此时,IgY 可获得良好的回收率为 91.7%,纯度也可提高一倍以上。

2.2 Na_2SO_4 盐析条件的优化

硫酸铵盐析一次获得的卵黄抗体,用去离子水溶解,再加入硫酸钠进行二次盐析,进一步去除杂蛋白,提高抗体的纯度。实验分别取 60~180 g/L 一系列硫酸钠质量浓度梯度进行盐析后,经 SDS-PAGE 检测。将电泳结果运用 Lab-Image 软件分析,推算出盐析产物中 IgY 的纯度。由 SDS-PAGE 电泳结果可见(图 2),随着硫酸钠质量浓度从 60~180 g/L 的梯度增加,IgY 的析出量逐渐增多。



1. WSF; 2. 标准鸡 IgY; 3. 60 g/L; 4. 80 g/L; 5. 100 g/L; 6. 120 g/L; 7. 140 g/L; 8. 160 g/L; 9. 180 g/L; 10. 饱和度 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

图2 二次盐析时不同质量分数 Na_2SO_4 纯化 IgY 的 SDS-PAGE 图

Fig. 2 SDS-PAGE (non-reducing) pattern on 7.5% gel of IgY purified by Na_2SO_4 precipitation of different percentage concentration

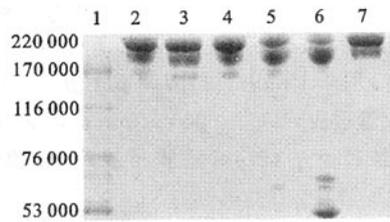
根据免疫扩散结果分析,计算出盐析产物中的抗体和蛋白质得率(见表 2 和图 3)。硫酸钠质量浓

度低于 80 g/L 时,大部分蛋白质残留于盐析上清液中,IgY 基本没有析出。随着硫酸钠的不断增多,愈来愈多的 IgY 由可溶性状态转为沉淀析出。但当硫酸钠质量浓度高于 140 g/L,析出的杂蛋白量逐渐增多,纯度有所下降。硫酸钠质量浓度过低时不能使溶液中的 IgY 完全沉淀,而过高的硫酸钠会使愈来愈多的杂蛋白沉淀析出,影响盐析产品的 IgY 纯度。综合考虑回收率及纯度,选择 140 g/L 为硫酸钠合适的质量浓度。

表 2 IgY 的 Na_2SO_4 盐析结果

Tab. 2 Na_2SO_4 precipitate of IgY

Na_2SO_4 质量浓度/(g/L)	沉淀	
	回收率/%	纯度/%
100	12	74.0
120	43	78.2
140	46	77.0
160	70	72.0
180	82	60.2



1. 相对分子质量标样; 2. 纯化后的 IgY 冻干粉; 3. 二次盐析后超滤; 4. 二次盐析; 5. 饱和度 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀; 6. WSF; 7. 标准鸡 IgY。每孔道 10 μg 蛋白。

图3 分离纯化 IgY 各阶段的 SDS-PAGE 图(非还原性)

Fig. 3 SDS-PAGE (non-reducing) pattern on 7.5% gel of IgY purified by different phases

2.3 IgY 的分离及纯化

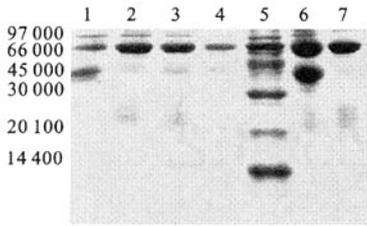
非还原条件下,样品中目的蛋白质的相对分子质量为 180 000(图 3);而在还原条件下,目的蛋白质被分为两条,一条相对分子质量为 6 000~7 000 的 IgY 重链,另一条相对分子质量为 2 000~3 000 的 IgY 轻链,这与相关文献相符^[6]。

由电泳结果可见(图 4),经过两步盐析,水溶性组分中的杂蛋白量明显下降,纯度显著提高,且从中可以看出冷冻干燥并未使 IgY 断裂,仍是一个完整的大分子。

2.4 分离纯化过程 IgY 活性变化

经过硫酸铵和硫酸钠两步盐析后,虽然抗体总量有所损失,但 ELISA 检测盐析前后特异性 IgY 活性结果表明,提纯后特异性 IgY 活性有了明显的

提高。冷冻干燥对 IgY 活性有一定影响(图 5)。



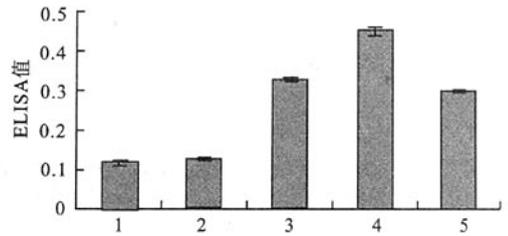
1. 饱和度 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀; 2. 二次盐析; 3. 二次盐析后超滤; 4. 纯化后的 IgY 冻干粉; 5. 相对分子质量标样; 6. WSF; 7. 标准鸡 IgY。每孔道 10 μg 蛋白。

图 4 分离纯化 IgY 各阶段的 SDS-PAGE 图 (还原性)

Fig. 4 SDS-PAGE (reducing) pattern on 15% gel of IgY purified by different phases

3 结 论

盐析法提取 IgY 的最佳条件是将粗提的 IgY



1. WSF; 2. 饱和度 50% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀; 3. 二次盐析; 4. 二次盐析后超滤; 5. 纯化后的 IgY 冻干粉

图 5 分离纯化过程中 IgY 活性变化

Fig. 5 Comparison of activity of IgY purified by different methods

经 50% 饱和度的硫酸铵盐析一次, 再经 140 g/L 硫酸钠盐析一次, 获得的 IgY 回收率可达 46%, 纯度可达 77%。这一结果为 IgY 的进一步分离纯化奠定了基础。

参考文献(References):

- [1] Rose M E, Orlans E, Buttress N. Immunoglobulin classes in the hens egg; Their segregation in yolk and white [J]. *Eur J Immunol*, 1974, 4: 521.
- [2] 那红, 杨曜中, 袁勤生. 鸡卵黄免疫球蛋白的研究进展[J]. *中国生化药物杂志*, 1997, 18(3): 151-155.
NA Hong, YANG Yao-zhong, YUAN Qin-sheng. Advance in Immunoglobulins from egg yolk[J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 1997, 18(3): 151-155. (in Chinese)
- [3] Akita E M, Nakai S. Immunoglobulins from egg yolk; isolation and purification [J]. *J Food Sci*, 1992, 57: 629-634.
- [4] Akita E M, Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain [J]. *J Immunol Methods*, 1993, 160: 207-214.
- [5] Jin L Z, Baidoo S K, Marquardt R R et al. In Vitro Inhibition of Adhesion of Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to Piglet Intestinal Mucus by Egg-yolk Antibodies [J]. *FEMS Immunol Med Mic*, 1998, 21: 313-321.
- [6] Leslie G A, Clem W L. Phylogeny of immunoglobulin structure and function III: Immunoglobulins of the chicken [J]. *J Exp Med*, 1969, 130: 1337-1352.

(责任编辑:朱明)