

猪血免疫球蛋白的分离及功能性研究

杨严俊 王荣民 Anne Mc Cannel

(无锡轻工大学)

(哥伦比亚大学)

摘要 使用食品级的多聚磷酸钠(以下简称 Sp)絮凝剂分离猪血浆中的免疫球蛋白,配合随机质心映射优化程序(RCO)确定分离最佳条件,并用 ELISA 初步测定了粗制 IgG 的各种功能特性。

主题词 猪血浆;免疫球蛋白;分离

中图分类号 TS209

0 前 言

猪血经离心得到的血浆中有 7% 的蛋白质通常都是作为营养强化剂或食品添加剂,但其中约 2% 具有生理活性的免疫球蛋白却没有被重视。

最近几年,国际上对动物血发生了越来越大的兴趣。因为血中的免疫球蛋白、转移因子、胎球蛋白、粘连纤维蛋白等活性物质在被动免疫致癌基因转化、生长启动等功能方面发挥重要作用^[1]。对免疫球蛋白作为婴儿或成人食品添加剂作了深入的研究后,发现口服免疫球蛋白具有抵抗各种疾病特别是胃肠病的能力,并由此而产生了第二代具有生理活性的母乳化奶粉及功能性食品。对动物食用免疫球蛋白亦进行了大量研究,如给仔猪喂养从血中提取的免疫球蛋白,结果表明仔猪增重较快而且不容易发生腹泻疾病,死亡率也明显低于对照组^[2]。

许多科学家强调了在婴儿食品中添加免疫球蛋白的重要性,加拿大不列颠哥伦比亚大学的研究人员做了大量工作^[3~5]。最近美国 Stolle Milk biologics International company 开始生产功能性奶粉,该产品含有抗 24 种威胁人类健康的病毒及细菌和免疫球蛋白,正常服用可增强人体的抗病能力。

作者用新型分离剂对分离猪血浆 IgG 作了初步研究,以期生产新一代母乳化奶粉打下基础。

1 试剂与仪器

1.1 试剂

收稿日期:1995-04-13

新鲜猪血 采自上海龙华和无锡肉联厂;SPA-HRP 酶联试剂 卫生部上海生物制品研究所出品;大肠杆菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌 无锡市第三人民医院提供。

1.2 仪器

岛津 930 电泳定量扫描仪 日本岛津公司;DG3022A 酶联免疫吸附检测仪 南京华东电管厂;ISI-SX-40 扫描电子显微镜;日本明石公司;DSC 差热扫描分析仪 美国 PE 公司。

2 实验方法

2.1 沉淀分离实验(Sp)

20% (W/V) 和 5.13mol NaCl 溶液加入 40g 血浆,然后用 0.7mol/L HCl 调整 pH 至指定值,最终再加蒸馏水至 60g 重,在指定温度下,搅拌 30min,离心(3000r/min,5min)得到清液,即为富集的粗 IgG 溶液,而沉淀则为粗猪血清白蛋白。

2.2 分离 IgG 的定性定量分析

2.2.1 SDS-PAGE 电泳及电泳扫描实验 在沉淀实验中,得到的粗 IgG 经 SDS-PAGE 电泳,得到 IgG 电泳区带,IgG 轻链(LC)的分子量仅为 2 万多,因而和其他蛋白质区带分离相当清楚,而重链(HC)由于其分子量在 5.5~7.0 万之间不等(不同亚类的 IgG 具有不同的分子量重链,而轻链只有一种分子量),恰好和血清白蛋白的分子量相当,所以,很难区分出来。因此,根据电泳扫描后得到的轻链的百分比来确定其分离率即 $SE\% = PA_{IgG}/P_{total} \times 100\%$,对标准 IgG 的电泳扫描分析显示,其轻链与重链的比值为 1:1.5,从而可以计算出粗 IgG 的纯度为:

$$P\% = \frac{PA_{HL} \times 2.5}{PA_{total}} \times 100\%$$

2.2.2 DSC 测定 IgG 变性温度 分别对粗制和纯 IgG 样品进行 DSC 差热分析,样品 4mg 密封在铝制的小盘子里,用 DSC 差热扫描分析仪进行温度扫描,范围为 20~100 C,升温速率为 10 C/min,记下变性时出现的峰值温度。

2.2.3 酶联免疫吸附实验(ELISA) SPA-HRP 酶联试剂(金黄色葡萄球菌的 A 蛋白和辣根过氧化酶酶联标记试剂)用间接法和竞争夹心法来分别测定 IgG 的免疫活力和胃蛋白酶对 IgG 免疫功能的影响。

2.3 粗制 IgG 对细菌生长的抑制作用及絮凝实验

在无菌条件下,配制 IgG 溶液(0.01mol/LPBS,pH7.4)6mg/ml,把 1ml 此 IgG 溶液和 1×10^8 CFU/ml 菌液浓度溶液混合,以 1ml 无菌生理盐水和 1ml 菌液混合作为空白对照,并用电镜观察粗 IgG 和细菌结合的情况。

2.4 免疫球蛋白营养性评价(氨基酸组成成分分析)

用 400~800 倍于样品蛋白质质量的 6mol/LHCl,110 C,水解 24h,用氨基酸自动分析仪分析。

3 结果与讨论

3.1 分离实验

使用 Sp 分离免疫球蛋白(主要含 IgG,以下简称粗 IgG),具有安全无毒,低残留盐分,不易变性,操作简便的优点。影响 Sp 分离免疫球蛋白的 4 个主要因素为 Sp%、NaCl%、pH、

T . 使用了 Dr. Nakai 的 RCO 优化程序来优化分离粗 IgG. 当确定了 Sp、NaCl、pH、 T 搜索范围后(见表 1), 经过 15 次实验得到了最佳的分离条件(见表 2), 其最终结果为 Sp=3.7, NaCl=2.5, pH=3.6, T =13 C 时, 粗 IgG 的纯度达 50.6%. 其免疫活力收率为 46%.

表 1 优化程序

区间	Sp (%)	NaCl (%)	pH	T (C)
下限	1	1	3	8
上限	6	5	5	20

表 2 最佳的分离条件

	Sp	NaCl	pH	T	Response		Sp	NaCl	pH	T	Response
1	3.0	1.4	3.8	10	35.2	9	3.5	2.9	3.9	14	45.2
2	1.7	1.3	4.9	23	19.6	10	3.6	3.3	3.9	15	41.6
3	1.1	4.5	3.9	18	39.4	11	3.6	3.3	3.9	15	41.6
4	5.0	4.6	3.9	18	39.4	12	3.8	2.4	3.5	13	46.2
5	4.7	1.2	4.3	10	38.8	13	3.7	2.5	3.6	13	50.6
6	5.0	4.8	4.3	18	20.6	14	3.6	2.6	3.7	12	48.3
7	5.1	2.5	4.6	24	8.3	15	3.5	2.7	3.8	1.2	43.8
8	3.8	4.4	3.2	10	14.9						

3.2 粗 IgG 的功能特性

3.2.1 不同个体的猪的粗 IgG 对 4 种细菌的免疫活力的比较 用 ELISA 方法比较了 5 个不同个体的粗 IgG(即图中曲线 1,2,3,4,5)及自制的具有代表性粗 IgG(以 20 个以上猪的混合血清中提取的 IgG)(即图中曲线 6), 大肠杆菌、沙门氏菌、金葡菌、绿脓杆菌等 4 种细菌的免疫活力。见图 1,2,3,4.

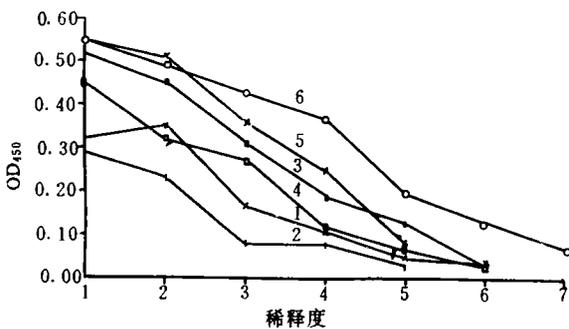


图 1 大肠杆菌

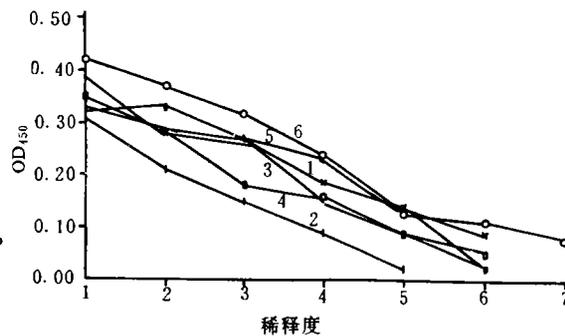


图 2 沙门氏菌

由 1~4 图可知, 不同个体的 IgG 对不同的细菌具有不同的免疫活力, 这取决于其是否受该细菌感染。

3.2.2 温度对 IgG 的影响 配制粗 IgG 的 PBS 溶液(pH=7.4), 浓度为 3mg/ml 分别置于 7,27,37,47,57,67,77 和 87 C 恒温水浴中, 30min 后, 用 ELISA 测定其免疫活力。得到图 5.

由图 5 可知, 当温度低于 57 C 时, 免疫活力几乎没有变化, 但从 57 C 开始发生变化, 至 77 C 基本丧失活性。

另外, 免疫球蛋白的 DSC 图谱显示, 纯 IgG 的变性温度仅为 50 C 左右, 而粗 IgG 的变

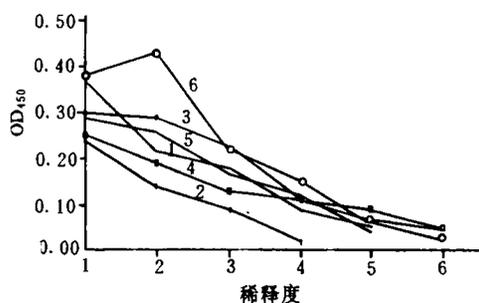


图3 金葡萄

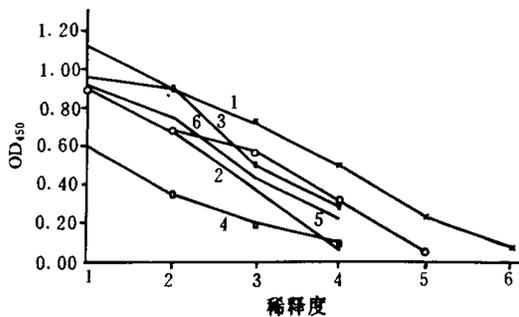


图4 绿脓杆菌

性温度达 81 C 左右,纯蛋白的耐热性反而较低,这说明如要得到耐热性高的免疫球蛋白,应保持一定的杂质,这样有利于其应用。

3.2.3 pH 对 IgG 的影响 用柠檬酸缓冲液配制不同 pH 梯度的粗 IgG 溶液(pH=6.28, 5.45,4.52,3.90,3.65,2.60,2.02,1.15),浓度为 3mg/ml,3h 后用 ELISA 方法测定 4 种菌的免疫活力。得到图 6。

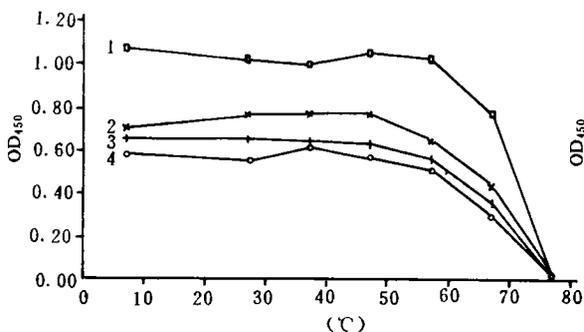


图5 不同温度下的免疫活力

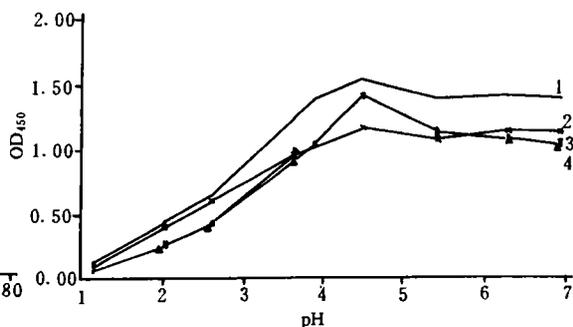


图6 不同 pH 下的免疫活力

1 绿脓杆菌 2 大肠杆菌 3 金葡萄 4 沙门氏菌

1 金葡萄 2 大肠杆菌 3.4 沙门氏菌和绿脓杆菌

从图 6 可看出,当 pH 在 6.28~3.65 时,免疫活力基本没有变化,当 pH 低于 3.65 时开始下降,至 1.15 基本没有活力,但是在 pH=2.6~2.02 时,仍保持约 1/3~1/4 的活力。

3.2.4 胃蛋白酶对 IgG 的影响(模拟人体消化系统) 配制 IgG 的醋酸缓冲溶液(pH4.0),浓度为 10mg/ml,胃蛋白酶以 5 : 1,5 : 4 的比例混合,处理 3h 后,测定其剩余免疫活力,见表 3。

表3 剩余免疫活力

OD ₄₅₀	检 菌 种 类			
	大肠杆菌	沙门氏菌	金葡萄	绿脓杆菌
空 白	0.00	0.00	0.00	0.00
消化样品	0.80	0.95	0.90	0.90
对照样品	1.24	1.36	1.24	1.04

经高浓度胃蛋白酶处理,免疫球蛋白大部分被断裂成 F(ab)₂ 片段及 Fc 的碎片(一些小肽),裂解后的 F(ab)₂ 仍然可以和细菌结合,但因失去 Fc 片段后,不能跟 SPA-HRP 酶联试剂反应,所以,普通 ELISA 方法证实,基本没有完整的 IgG。但运用竞争性 ELISA 方法,证明其 F(ab)₂ 片段仍然具有结合细菌的能力,虽然其活力降低,而经低浓度的胃蛋白酶处理,仍然有相当多的 IgG 没有断裂,因此仍

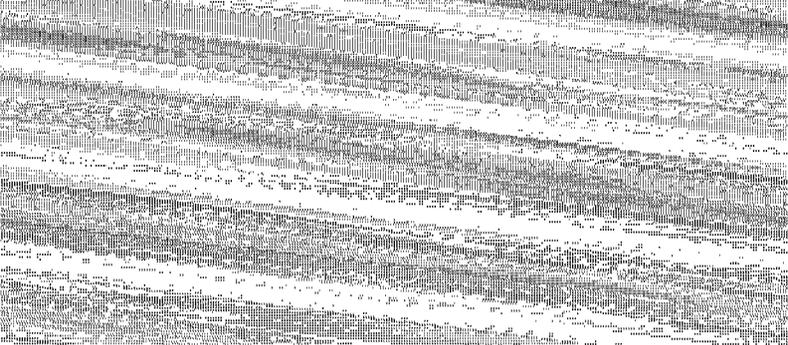


表4 氨基酸组成成分

	猪血浆	猪 IgG	牛血浆	牛 IgG		猪血浆	猪 IgG	牛血浆	牛 IgG
ASP	0.33	8.5	10.0	8.8	ILE	1.44	3.2	2.8	2.8
THR	5.09	8.3	6.4	9.1	LEU	2.62	8.1	9.0	7.5
SER	1.33	9.0	6.4	10.9	TYR	0.9	5.9	5.0	3.7
GLU	4.93	12.1	13.4	10.4	PHE	3.42	5.3	5.0	3.7
PRO	1.4	7.0	5.3	1.6	HIS	0.93	3.0	3.6	3.3
GLY	3.63	4.8	3.8	4.8	LYS	2.41	6.4	9.1	6.5
ALA	5.22	4.4	4.6	4.0	ARG	1.81	6.0	0.8	6.0
VAL	3.17	7.7	6.0	9.0	CYS	0.7	ND	2.6	ND
MET	3.71	0.3	1.2	1.1					

猪 IgG 氨基酸组成跟牛 IgG 基本近似,说明两者种属差异不是很大。

4 结 语

1) 本产品免疫球蛋白可作为婴儿奶粉或饲料的免疫活性增强剂。因此,可以预计,免疫球蛋白产品的市场前景良好。而且,其属于高附加值产品。使用本法比传统的方法具有安全无毒,价格低廉,操作方便的优点,因此会有较好的经济效益。

2) 在免疫球蛋白的生产工艺中,由于国内超滤技术还不过关,因此,对于免疫球蛋白的工业化生产还是一个难题。因此,如能顺利解决超滤技术,将大大促进免疫球蛋白的工业化生产。

3) 在今后的工作中,将尝试从其它不同原料中提取免疫球蛋白,以便找到成本低、质量好、操作方便的其他免疫球蛋白,作为食品免疫增强剂,开发新一代的母乳化奶粉。

参 考 文 献

- 1 Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R. *Biochem. Biophys Acta*. 1985. 846:185
- 2 Kennelly J J, Bell R Q, Aherne F X. *Can. J. Animal. Sci.* 1979. 59:693
- 3 Hatta H, Shimizu J S, Nakai S J. *Food Sci.* 1988, 53: 425~427
- 4 Kaneko T, Wu B T, Nakai S. *J. Food Sci.* 1985, 50:1531
- 5 Mccannel A, Nakai S. *Can Inst Sci Technol*, 1990, 123(1):42~46

Studies on Functional Properties of Pig Serum Immunoglobulin

Yang Yanjun Wang Rongmin Anne Mc Cannel

(School of Food Science & Technology) (University of British Columbia)

Abstract Immunoglobulin separation from pig plasma using food grade Sodium polyphosphate (Sp) was optimized by the RCO program. The activity and function of the crude IgG was measured by ELISA.

Subject-words Pig plasma; Immunoglobulin; Separation