

鸡卵黄免疫球蛋白(IgY)分离纯化的研究

任平国, 徐启红

(漯河职业技术学院, 河南 漯河 462000)

摘要: 对鸡卵黄免疫球蛋白(IgY)的分离纯化进行了研究。工艺流程为: 卵黄→8倍水稀释并搅拌10 min→用HCl调pH至5.2后在4℃静置2 h去沉淀→在上清液中加入95%冰乙醇(-20℃)使终浓度为60%(v/v)→4℃搅拌20 min后离心(22000 r/min, 4℃, 25 min)→收集沉淀并加入0.028 mol/L NaCl溶液在4℃下过滤除去脂蛋白沉淀→收集的滤液用SDS-PAGE法进行纯化得纯度为98%的IgY。用大肠杆菌(*E.coli*)对其活性进行测定, 效果良好, 此方法能保持免疫球蛋白的活性。

关键词: 鸡卵黄免疫球蛋白(IgY); 乙醇沉淀; 分离纯化

中图分类号: TQ936.21; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2007)11-0024-03

Analysis on the Separation and Purification of Immunoglobulin of egg yolk (IgY)

REN Ping-guo, XU Qi-hong

(Luohe Vocational Technology College, Luohe 462000, China)

Abstract: The separation and purification of Immunoglobulin of egg yolk (IgY) were studied. The mixture of yolk and water (1:8, v/v) was stirred for 10 min and then its pH value was adjusted to 5.2 with HCl. After placing the mixture for 2 h at 4℃, the supernatant was diluted with 95% ice ethanol (-20℃) until its concentration reached 60% (v/v). Then the solution was stirred for 20 min at 4℃ and centrifuged (22000 r/min) for 25 min at 4℃. The precipitate was collected and added into 0.028 mol/L NaCl solution. The corresponding suspension was filtered at 4℃ to remove the lipoprotein sediment and the filtrate was then purified by SDS-PAGE methods, giving the protein IgY with the purify of 98%. Its activity was determined with *Escherichia coli* (*E.coli*) and results showed that this purification method could well maintain the activity of IgY.

Key words: immunoglobulin of egg yolk (IgY); ethyl alcohol precipitation; separation and purification

鸡卵黄免疫球蛋白(Immunoglobulin of egg yolk, 简称 IgY), 又称鸡卵黄抗体, 是母鸡血液中的免疫球蛋白传递至鸡卵黄并在子鸡孵育过程中和孵育后对子鸡起保护作用的免疫球蛋白。经大量的研究发现, IgY 具有不与人类补体^[1]以及类风湿因子结合^[2]等免疫学特性, 现在已被广泛应用于免疫学诊断和医药等许多方面, 因而对 IgY 分离纯化的研究有着重要意义。IgY 的分离、纯化主要包括含有 IgY 的蛋黄水溶性蛋白组分(WSF)的分离和 WSF 中 IgY 的分离。目前, 国际上已经开发了多种鸡卵黄抗体分离纯化法, 主要包括有机溶剂抽提、盐析与 DEAE 色谱相结合、疏水色谱及凝胶过滤等。然而, 这些方法普遍存在着步骤多、批量小、安全性不高和回收率低等问题。为此, 我们以 Horikoshi^[3]等人提出的冰乙醇分级离心法为基础, 对冰乙醇分级离心法分离纯化进行了深入的研究, 取得了较为理想的结果, 且分离纯化得到的 IgY 活性比较好。

收稿日期: 2007-07-16

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

市售新鲜鸡蛋或4℃保鲜鸡蛋若干; 95%冰乙醇(-20℃, 预冷); 0.028 mol/L的NaCl溶液; Tris-HCl缓冲液; Sephadex G200凝胶(深圳市腾龙源实业有限公司); DEAE葡萄糖凝胶A-50(北京百星高科技技术货物进出口公司); SDS-PAGE成套电泳试剂(Amersham Biosciences (SF) Corporation); 考马斯亮蓝R-250(北京索莱宝科技有限公司); 721分光光度计(上海第三分析仪器厂); LG10-2.4A高速离心机(北京医用离心机厂); 大肠杆菌(*E.coli*)(卫生部中国药品生物制品鉴定所); 其它试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋黄水溶性组分(WSF)的制备

选择市售新鲜鸡蛋或于4℃保鲜的鸡蛋, 用卵黄分离器去除蛋白, 之后将卵黄于滤纸上滚动, 吸干, 刺破卵黄膜, 收集卵黄。以体积百分比计, 用一定倍

数的蒸馏水稀释卵黄, 搅拌10 min, 使水溶性IgY充分溶出。用HCl调节pH至4.5~5.4, 稀释液在4℃静置2 h, 去沉淀。向上清液中加入95%冰乙醇(-20℃)至某一浓度, 4℃搅拌20 min后离心(22000 r/min, 4℃, 25 min), 收集沉淀并向其中加入0.028 mol/L的NaCl溶液, 4℃条件下过滤除去脂蛋白沉淀, 收集滤液得到澄清的水溶性蛋白组分(WSF)。

1.2.2 乙醇沉淀纯化IgY

取制备好的WSF, 向其加入95%冰乙醇(-20℃)使其终浓度达到30% (v/v), 也可将最终浓度调至25% (v/v)^[4], 离心(22000 r/min, 4℃, 25 min), 将沉淀用蒸馏水溶解, 并用DEAE葡萄糖凝胶A-50离子交换层析, Tris-HCl缓冲液(含0.15 mol/L NaCl)洗脱, 然后用Sephadex G200凝胶过滤。

1.2.3 蛋白质回收率的确定及IgY纯度的测定

蛋白质回收率可采用福林-酚法进行确定^[5]。

IgY的纯度则采用十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法进行测定^[6]。

1.2.4 IgY的活性检测

以大肠杆菌为试验菌株, 进行抑菌实验。将试验菌株分别接种于含有蛋黄抗体和对照组的液体培养基中, 在37℃条件下恒温培养, 不同时间下从培养物中取样, 置于600 nm波长下测定各样品的吸光度(OD)值。

2 结果与讨论

2.1 稀释倍数的影响^[7]

由于鸡卵黄中含有大量的磷脂蛋白, 因此首先采用水稀释法去除其中的大部分卵磷脂蛋白。蛋黄中加入不同倍数($V_{水}:V_{蛋黄}=1:1\sim 11:1$)的无菌水, 用盐酸调节稀释液pH至5.2, 测定上清液中的脂肪和可溶性蛋白质含量, 其结果如图1。

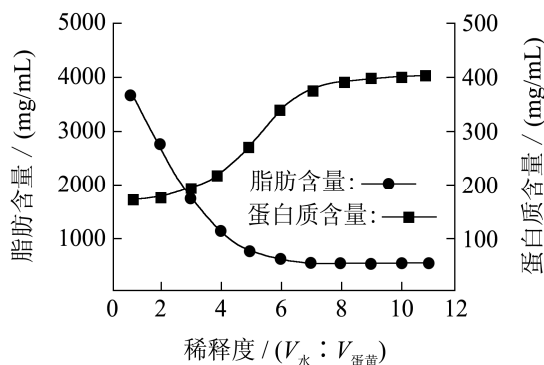


图1 稀释倍数对脂肪及蛋白质含量的影响

从图1可看出, 随着稀释倍数的增大, 蛋白质的含量也逐渐增加, 而脂肪含量则逐渐下降, 当稀释倍数 v

水: $v_{蛋黄}=8:1$ 时, 蛋白质和脂肪含量趋于稳定。考虑到后续的纯化操作, 以选取8倍稀释为宜。

2.2 pH值的影响^[8]

取20 mL的8倍稀释度蛋黄液, 依次改变其pH值(4.5~5.4), 并测定相应的IgY回收率。pH的变化对IgY回收率的影响见图2。

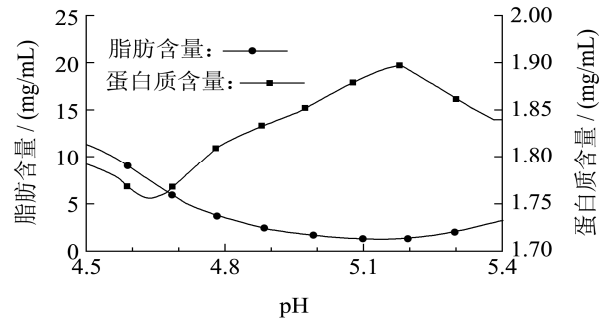


图2 pH值对脂肪及蛋白质含量的影响

从图2知, 在微酸性条件下IgY的回收率较高, 脂蛋白的回收率在稀释液pH 5.2时最小, 说明稀释液的pH=5.2时可获得较好的分离效果。

2.3 乙醇的影响

将8倍稀释度蛋黄液离心后, 其上清液以脂蛋白为主, 为此我们采用向其中添加95%冰乙醇(-20℃)的方法除去脂蛋白, 乙醇体积分数依次取20%~80%, 其影响情况如图3所示。

由于乙醇的添加量将影响终产物中的蛋白质含量及免疫球蛋白活性, 经过对比乙醇添加量最终确定乙醇的体积分数为60%。

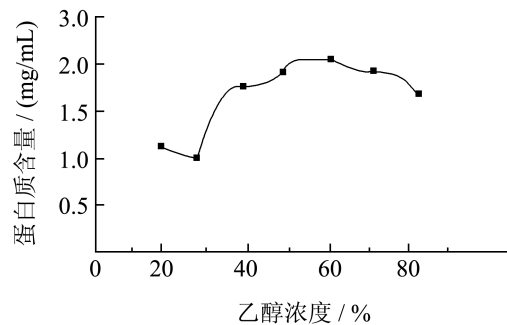


图3 乙醇添加量对蛋白质含量的影响

2.4 盐浓度的影响

收集加入冰乙醇(体积分数为60%)经搅拌离心后得到的沉淀, 向其中依次加入0.005~0.035 mol/L的NaCl溶液以去除沉淀中杂质蛋白。去除结果如图4所示。

由图4可以看出, 利用NaCl来溶解离心得到的沉淀时, NaCl溶液的浓度不同所得产物的产率也不一样。当NaCl溶液浓度为0.028 mol/L时, 蛋白质获取率最高, 并且杂蛋白的去除情况也较为理想。

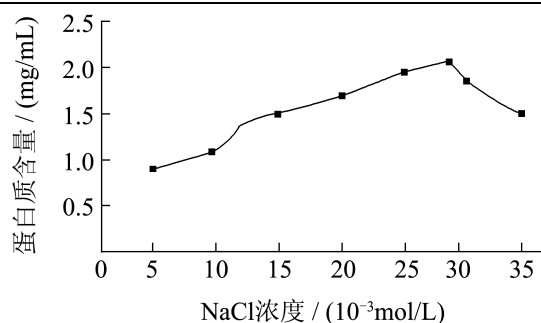


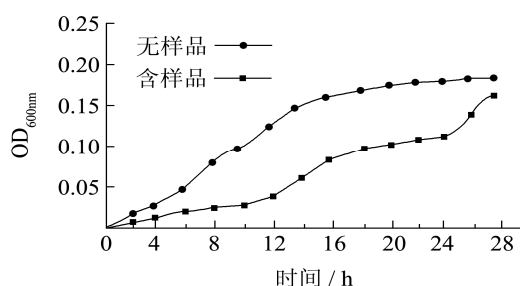
图4 浓度对蛋白质获取量的影响

2.5 IgY纯度的测定

采用十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法进行: Laemmli体系, 4%浓缩胶, 10%分离胶, 恒压150 V, 加样量1~10 mg, 电泳后的凝胶分别采用考马斯亮蓝R-250和糖蛋白染色, 分析测定所得IgY的纯度可达98%。

2.6 IgY活性的检测^[9]

以大肠杆菌(*E.coli*)为试验菌株进行抑菌实验。将试验菌株分别接种于含有蛋黄抗体和对照组的液体培养基中, 在37℃条件下恒温培养, 不同时间下从培养物中取样, 置于600 nm波长下测定各样品的吸光度(OD)值。检测结果如图5。

图5 IgY对大肠杆菌(*E. coli*)生长的影响

由图5可看出IgY对大肠杆菌(*E.coli*)在生长初期

有明显的抑制作用, 试验组和对照组的OD值有明显的差异, 而经过24 h后抑制作用下降。

3 结论

3.1 通过实验确定的冰乙醇分级离心法分离纯化IgY的最佳条件为: 卵黄液用蒸馏水以1:8进行稀释, 用HCl调节pH为5.2, 乙醇添加量为60% (v/v), 离心(22000 r/min, 4℃, 25 min)并用0.028 mol/L的NaCl溶液过滤。最终通过提取分离纯化工艺可以得到纯度达98%的IgY。

3.2 本方法操作较为简便, 易于去除杂质, 且所得IgY的纯度很高, 适用于大规模生产。

参考文献

- [1] Hoffman W L, Ruggles A O, Tabarya D.J. Immunol. Methods, 1996, 198: 67-77
- [2] Larsson A, Sjoquist J.J. Immunol. Methods, 1998, 108: 205-208
- [3] Toshio Horikosh T, Hiraoka J, Saito Metal. J. Food Science, 1993, 58(4): 739-742
- [4] 易全茂, 谢艳霞. 鸡卵黄抗体研究进展[J]. 动物科技, 2004, 21(2): 44-45
- [5] Lorwry O H, Rosebrough N, Farr A. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265-275
- [6] 奥斯伯等. 精编分子生物学指南. 北京: 科学出版社, 1999
- [7] 宋宏新, 刘玄, 梁艳. 鸡卵黄免疫球蛋白的分离制备研究[J]. 食品科学, 2005, 26(4): 51-54
- [8] 康亦兼, 咸漠, 李文兴. 水稀释法分离卵 IgY[J]. 吉林大学自然科学学报, 2001, 3: 84-86
- [9] 曹小红, 等. 低温乙醇除脂法纯化鸡卵黄中免疫球蛋白[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(3): 66-70

(上接第21页)

参考文献

- [1] Hartmann M. Ordered Mesoporous Materials for Bioadsorption and Biocatalysis[J]. Chemistry Material. 2005, 17: 4577-4593
- [2] Miyahara M, Vinu A, Hossain, K. Z., et al. Adsorption Study of Heme Proteins on SBA-15 Mesoporous Silica with Pore Filling Models[J]. Thin Solid Films, 2006, 499: 13-18
- [3] Yin H.H.P., Wright P.A. Enzyme Immobilisation Using Siliceous Mesoporous Molecular Sieves[J]. Microporous and Mesoporous Materials, 2001, 44(45): 763-768
- [4] Zhao Dongyuan, Feng Jianglin, Qisheng Huo, et al. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores[J]. Science, 1998, 279: 548-552
- [5] 袁勤生, 赵健. 酶与酶工程[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2005
- [6] Vinu A., Murugesan V., Hartmann, M.. Adsorption of lysozyme Over Mesoporous Molecular Sieves MCM-41 and SBA-15: Influence of pH and Aluminum Incorporation[J]. J. Phys. Chem. B, 2004, 108: 7323-7330