國立臺灣師範大學生命科學系碩士論文

雞蛋IgY抗體的生產與純化研究

Production and purification of IgY polyclonal antibodies in egg yolk of chicken

研 究 生：汪 宗 明

Zong-Ming Wang

指導教授：王 玉 麒 博士

Dr. Yu-Chie Wang

中 華 民 國 101 年 七 月

致謝

由衷感謝指導教授王玉麒老師的細心指導，教導我以最嚴謹審慎的態度來面對研究，發揮實事求是的精神，在實驗方面也給予充分的資源與精神上的鼓勵，讓我的研究能順利完成，也十分細心的指導論文寫作的奧義，讓我的求學過程有個美好的結果。感謝王老師在我的碩士學習過程中不僅讓我學習到「科學素養」，也分享我許多生活哲理，讓我對生活中的大小事皆能有新的體悟。感謝陳昌平老師、李冠群老師、王玉麒老師在百忙之中撥冗悉心批閱，並提供我許多寶貴的建議與指導。

感謝實驗室的學長、同學、學弟們：哲雄、永順、超凡、政霖、書宏、韻如、周坤、奕輝、泰霖、國緯等人，提供我許多實驗上的建議以及幫忙；感謝生科系籃球隊的諸位隊友們，讓我能跟大家一起運動，保持良好體態與精神來面對研究中的挑戰；感謝從高中就認識到現在的好兄弟姊妹們以及巴清雄大哥，雖然各分東西、各自打拼，但不時的接收到大家的鼓勵和消息，讓我能夠持續朝自己的目標邁進。

最後，要感謝多年來持續對我關心與支持的父母親、家人們以及君薇，因為有你們的鼓勵與期望，才能讓我不斷的在遭受困境之際，接受挑戰並且勇敢面對，讓我能夠順利完成學業。謹以此論文獻給所有愛我及我愛的人。

目錄

摘要 …… 1

Abstract …… 2

第一章 前言 …… 3

一、動物免疫防禦機制 …… 3

二、抗體的應用 …… 4

三、鳥類的免疫系統 …… 6

四、鳥類抗體的多樣性 …… 7

五、鳥類的抗體 …… 8

(1) 鳥類的抗體介紹 …… 8

(2) IgY 結構與特性 …… 9

(3) 雞蛋蛋黃中的 IgY …… 11

(4) 其他形態的 IgY …… 11

六、蛋黃IgY的應用 …… 12

七、IgY萃取方法 …… 13

八、研究目的 …… 15

第二章 快速、有效與低成本的蛋黃 IgY 萃取方法 …… 20

第一節 摘要 …… 20

第二節 緒言 …… 22

第三節 材料與方法 …… 25
1. 蛋黃的收集 …… 25
2. 蛋黃 IgY 的粗萃取 …… 25
3. 蛋黃 IgY 的硫酸銨鹽析沉澱 …… 25
4. SDS 膠體電泳分析 …… 26
5. 蛋黃 IgY 的定量分析 …… 26
6. 蛋白質定量 …… 27
7. 統計分析 …… 28
第四節 結果 …… 29
1. 蛋黃萃取溶液的測試 …… 29
2. 粗萃取蛋黃 IgY 的攪拌時間測試 …… 32
3. pH 值對蛋黃 IgY 的萃取效果探討 …… 35
4. 蛋黃稀釋液於攪拌期間的 pH 值變化情形 …… 40
5. 蛋黃粗萃液的硫酸銨鹽析沉澱測試 …… 42
第五節 討論 …… 46
第三章 冷凍蛋黃 IgY 的簡易、有效萃取方法 …… 54
第一節 摘要 …… 54
第二節 緒言 …… 56
第三節 材料與方法 …… 59

1. 蛋黃的收集 …… 59
2. 冷凍蛋黃的氯仿萃取 …… 59
3. 蛋黃 IgY 的硫酸銨鹽析沉澱 …… 59
4. SDS 膠體電泳分析 …… 59
5. 蛋黃 IgY 的定量分析 …… 60
6. 蛋白質定量 …… 60
7. 統計分析 …… 60
第四節 結果 …… 61
1. 冷凍蛋黃萃取 IgY 的過程 …… 61
2. 氯仿使用量與蛋黃粗萃取液的蛋白質分析 …… 63
3. 蛋黃粗萃液的硫酸銨鹽析沉澱測試 …… 66
第五節 討論 …… 69
第四章 由雞隻蛋黃生產小鼠免疫球蛋白之多株抗體 …… 74
第一節 摘要 …… 74
第二節 緒言 …… 75
第三節 材料與方法 …… 78
1. 雞隻免疫注射 …… 78
2. 雞隻靜脈抽血 …… 78
3. 蛋黃的收集 …… 79

4. 蛋黃 IgY 的氯仿萃取 ……. 79

5. 血清與蛋黃中的專一性 IgY 效價檢測 …… 79

6. SDS 膠體電泳分析 …… 80

7. 免疫轉漬實驗 …… 81

第四節 結果 …… 82

1. 專一性 IgY 在雞隻血清與蛋黃中的表現情形 …… 82

2. 蛋黃中 IgY 的專一性測試 …… 87

第五節 討論 …… 89

第五章 抗原吸附層析純化蛋黃中 IgY …… 97

第一節 摘要 ……..…….. 97

第二節 緒言 ……. 98

第三節 材料與方法 …….. 100

1. 萃取 Balb/c 小鼠 B 細胞 mRNA ……. 100

2. 聚合酶連鎖反應 …… 101

3. DNA 電泳與純化目標 DNA 片段 …….. 101

4. 萃取質體 pET-24a 之 DNA …… 102

5. 限制酵素反應 …… 102

6. 選殖載體構築 …… 103

7. 製備大腸桿菌勝任細胞（competent cell）……. 103

8. 將選殖載體轉形至勝任細胞 …… 104

9. 大腸桿菌表現菌株製備 …… 104

10. 將選殖載體轉形至表現菌株 …… 105

11. 誘導表現重組蛋白質 ……. 106

12. IPTG 濃度對誘導表現效果測試 …… 107

13. 大規模誘導重組蛋白質並確認細菌內的存在形式 … 107

14. 萃取重組蛋白質 ……. 108

15. 重組蛋白質定量分析 …… 109

16. 製作抗原吸附管柱 …… 109

17. 雞隻免疫注射 …… 110

18. 蛋黃的收集與萃取蛋黃中 IgY …….. 110

19. 純化專一性 IgY …….. 110

20. 純化後 IgY 樣品對不同抗原的結合能力測試 ….. 111

21. IgY 純化前後的抗體效價比較 …… 112

22. SDS 膠體電泳分析 ……..… 113

23. 免疫轉漬實驗 ……..... 113

第四節 結果 …… 114

1. 表現載體的構築與大腸桿菌轉殖 ……..… 114

2. 以 IPTG 誘導細菌表現 rIgM-HC 的情形 …… 120

3. 抗原吸附管柱製作 …… 122

4. 純化專一性 IgY …… 123

5. 分析純化後的專一性 IgY …… 125

第五節 討論 …… 132

第六章 總結 …… 140

參考文獻 …… 142

附錄 …… 154

附錄一、縮寫對照表 …… 154

附錄二、中英對照表 …… 156

附錄三、膠體電泳分析之溶液配方 …… 161

附錄四、免液化學實驗之試劑配方 …… 163

附錄五、微生物培養基配方 …… 165

附錄六、rIgM-HC 的核甘酸序列 …… 166

圖目錄

第一章 前言

圖一、IgG、IgY、IgY(△Fc)的結構比較圖。…… 17

圖二、基因轉換的可能機制。…… 18

圖三、基因轉換過程示意圖。…… 19

第二章 快速、有效與低成本的蛋黃 IgY 萃取方法

圖一、兩種蛋黃粗萃液的蛋白質電泳分析結果。…… 31

圖二、不同攪拌時間的 IgY 萃取效果比較。…… 34

圖三、不同 pH 條件的蛋黃粗萃液之外觀情形。…… 37

圖四、將不同 pH 條件之蛋黃粗萃液進行電泳分析的結果。... 39

圖五、蛋黃稀釋液於攪拌期間的 pH 值變化情形。..... 41

圖六、不同鹽析產物的電泳分析結果。…… 45

第三章 冷凍蛋黃 IgY 的簡易、有效萃取方法

圖一、冷凍蛋黃的粗萃取過程示意圖。…… 62

圖二、氯仿處理之蛋黃粗萃取液的電泳分析結果。…… 65

圖三、蛋黃 IgY 經鹽析沉澱後的電泳分析結果。…… 68

圖四、冷凍蛋黃的 IgY 萃取流程圖。…… 73

第四章 由雞隻蛋黃生產小鼠免疫球蛋白之多株抗體

圖一、雞隻血清中專一性 IgY 的效價表現情形。…… 84

圖二、雞蛋蛋黃中專一性 IgY 的效價表現情形。…… 85

圖三、蛋黃與血清中專一性 IgY 的趨勢比較。…… 86

圖四、蛋黃中 IgY 針對不同免疫球蛋白的免疫轉漬分析。… 88

第五章 抗原吸附管柱純化蛋黃中 IgY

圖一、rIgM-HC 示意圖、DNA 電泳分析與表現載體圖譜。… 115

圖二、rIgM-HC 的胺基酸序列。……. 117

圖三、rIgM-HC 在三種大腸桿菌菌株表現情形。…… 118

圖四、rIgM-HC 在菌體中表現的存在形式。…… 119

圖五、IPTG 濃度對 rIgM-HC 表現的影響。…… 121

圖六、專一性 IgY 的純化情形。……..… 124

圖七、IgY 樣品純化前後的蛋白質分布情形。…… 127

圖八、純化後的 IgY 樣品對各型免疫球蛋白的免疫轉漬分析。……..… 128

圖九、純化後 IgY 樣品針對各型免疫球蛋白的辨識情形。… 130

圖十、純化前後 IgY 效價表現差異情形。…… 131

圖十一、rIgM-HC 與各型小鼠免疫球蛋白重鏈部分的胺基酸序列比對。…….. 139

表目錄

第二章 快速、有效與低成本的蛋黃 IgY 萃取方法

表一、兩種蛋黃粗萃取液的比較。…… 30

表二、低溫攪拌時間對蛋黃 IgY 及蛋白質的萃取效果比較。 33

表三、不同 pH 條件下，蛋黃粗萃液的 IgY 與蛋白質含量比較。…… 38

表四、蛋黃粗萃液的鹽析沉澱結果。…….... 44

表五、不同 IgY 萃取方法的比較。…….. 53

第三章 冷凍蛋黃 IgY 的簡易、有效萃取方法

表一、不同氯仿使用量對蛋黃成分萃取效果的比較。…… 64

表二、蛋黃 IgY 的鹽析沉澱結果。……..…… 67

第四章 由雞隻蛋黃生產小鼠免疫球蛋白之多株抗體

表一、各種生產雞隻專一性 IgY 的注射過程。…… 95

表二、小鼠 IgM 重鏈與小鼠、兔、羊之 IgG1 重鏈之胺基酸序列的 BLAST 結果。…….. 96

第五章 抗原吸附管柱純化蛋黃中 IgY

表一、製備 rIgM-HC 吸附管柱的情形。…….. 122

表二、各種小鼠免疫球蛋白的重鏈與輕鏈胺基酸序列的 BLAST 結果。……..... 137

摘要

IgY 是雞蛋蛋黃中的主要抗體，相較於以哺乳類動物生產 IgG 多株抗體，以雞蛋生產 IgY 多株抗體不但方式更為簡便、成本較低廉、產量也較為豐富，且程序也較符合人道要求。此外，由於鳥類與哺乳類動物的親緣關係較遠，IgY 在醫學應用上能減少偽陽性反應的發生，因此 IgY 多株抗體具有基礎研究、一般檢驗、醫學診斷與治療等多方面用途的應用潛力。

在本研究中，我們一方面以小鼠的 IgM 免疫球蛋白為模式抗原，對雞隻進行免疫注射，以探討生產專一 IgY 抗體之適當條件；另一方面也發展從液態蛋黃及冷凍蛋黃中粗萃取 IgY 的方法；此外，我們也利用基因工程的方式，生產抗原的重組蛋白質，並將其製備成吸附管柱，以純化獲得純度、效價及專一性皆優良的 IgY 抗體樣品。

本研究已成功建立以雞隻生產小鼠免疫球蛋白之 IgY 抗體的模式，可做為以雞隻生產其他相關抗原之 IgY 多株抗體的參考；我們也已開發出快速、經濟、有效的 IgY 萃取與純化方法，除了顯著提升萃取蛋黃 IgY 的效率與便利性之外，更能增進 IgY 抗體的應用範圍。

關鍵字：IgY、雞蛋蛋黃、抗體、免疫球蛋白、抗原、吸附管柱

Abstract

IgY is the major antibody in the egg yolk of chicken. There are so many advantages of IgY, the yield in the yolk is abundant, the cost of maintaining hens is low, the using of non-invasive methods to isolate IgY from yolks is more humane, and the false positive result is reduced due to large phylogenetic distance between mammals and birds, so that IgY is a useful tool for basic research, inspection, medical diagnosis and treatment.

In this study, we have injected mouse IgM into hens, in order to produce antigen-specific IgY and investigate the appropriate production conditions. On the other hand, we have developed two methods for extracting IgY from liquid form egg yolk and frozen egg yolk respectively. Furthermore, we produced a recombinant antigen protein by genetic engineering, then manufactured an antigen-adsorption column to purify IgY which is high purity, titer and specificity.

We have successfully established a production mode of chicken IgY against mouse immunoglobulins, which could be used as a useful reference for the production of IgY antibodies directed to other relevant antigents. We have also developed rapid, economic and effective IgY extraction and purification protocols. These protocols could not only significantly improve the efficiency and the convenience of IgY extraction from egg yolk, but also extend the applicability of IgYantibodies.

Key words : IgY, egg yolk, antibody, immunoglobulin, antigen, antigen-adsorption column

第一章 前言

一、動物免疫防禦機制

免疫系統是動物的自體防禦系統，可幫助個體辨識「非自體物質」，從而將之消滅或排除，以預防及保護個體免於外物入侵。脊椎動物具有先天性免疫（innate immunity）及適應性免疫（adaptive immunity）共同作用提供高度保護效果(Male, 2006b)。先天性免疫為對抗感染的第一道防禦機制，多在感染病原體前就已存在，如皮膚、黏膜、纖毛、胃中的胃酸、白血球細胞的吞噬作用（phagocytosis）、組織胺（histamine）輔助引發發炎反應等等(Male, 2006b, c)，皆屬於非專一性免疫反應，可將大多數外來物質抵擋在外，或迅速將之消滅。有些外來物質順利躲過先天性免疫的防衛之後，即面臨第二道防禦機制—適應性免疫(Male, 2006a)，其針對抗原具有高度專一性、記憶性、多樣性、自體與非自體辨識，可選擇性地消滅特定的外來物及分子。

適應性免疫反應包含行細胞免疫（cellular immunity）的T淋巴細胞（T細胞）與體液免疫（humoral immunity）的B淋巴細胞（B細胞）(Male, 2006a)。幹細胞在骨髓生成T細胞後，經血液移送至胸腺繼續發育，成熟的T細胞在膜上表現可辨識、結合抗原的抗原結合蛋白質，但只可辨識與主要組織相容複合物（major histocompatibility complex, MHC）結合的抗原，依功能可分為T輔助細胞（T helper cells, T_H）、

T毒殺細胞(T cytotoxic cells, T_C)與T抑制細胞(T suppressor cells, T_S) (Peter Lydyard et al., 2006; Platts-Mills, 2006)。B細胞的幹細胞在骨髓產生進而發育為成熟的B細胞，具表現、產生抗體的能力，當B細胞上的膜表現抗體在淋巴結遇上其專一的抗原時，便會被激活成為可以分泌抗體的漿細胞（plasma cell），一旦抗原被清除後，這些抗體會慢慢消失，部分的漿細胞則會分化成記憶B細胞（memory B cell） (Marini, 2006)，記憶B細胞的壽命較長，能表現與母細胞相同的膜結合抗體，當相同的抗原再次入侵時能迅速反應及增殖，以產生大量的抗體對抗抗原。抗體遭遇到抗原後，抗體的變異區能與抗原產生專一性的結合，保護其他正常細胞免受感染，並以Fc端與巨噬細胞結合，達到消滅抗原的目的。抗體又稱作免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)，存於血清中，目前已知哺乳類的抗體分子依重鏈端的序列差異主要可分為IgG、IgM、IgA、IgE、IgD五種類型(Jefferis, 2006)。

二、抗體的應用

抗體對抗原的結合具有高度專一性及吸附力，故抗體可被應用於特定抗原分子的鑑定、分析與純化等多種用途，目前已是基礎研究、一般檢驗、與醫藥治療的重要工具(Lipman et al., 2005; Newcombe et al., 2007)。目前應用的抗體類別依照生產方式的差異可分為多株抗體

（polyclonal antibody）與單株抗體（monoclonal antibody）兩種類型。單株抗體是在1975年發明的技術(Kohler et al., 1975)，抽取小鼠脾臟的B細胞並與瘤細胞融合，保留兩者的優點，製作出可不斷增生並持續分泌抗體的融合瘤細胞（hybridoma cell），其分泌的抗體為單一類型並僅針對抗原上的單一表位，適合應用於醫事檢測、醫學診斷、疾病預防及治療等等(Lipman et al., 2005)，如市面上的驗孕棒、驗孕條等產品即使用單株抗體偵測人類絨毛膜性腺激素（human chorionic gonadotropin, hCG）的β次單元(Franchimont et al., 1978; Krichevsky et al., 1988)；藉單株抗體的專一性辨識癌症細胞的表面蛋白或分泌蛋白，並發展出抗體標靶療法治療癌症(Chiarella, 2011; Yang et al., 2011)，可及早發現與治療；針對細菌表面蛋白生產的單株抗體，能快速、準確檢測食品中所含細菌種類與數量，避免人或動物食用後引起腸胃疾病，做為食品安全方面把關的工具(Velusamy et al., 2010)。

動物體受抗原刺激而引發免疫反應後，會誘發體內產生多種辨識該抗原不同表位（epitopes）的抗體分子，這些抗體分子的集合統稱為多株抗體（polyclonal antibodies）(Newcombe et al., 2007)；被誘發表現的抗體多分布於血液之中，故多株抗體的生產上，大多以兔、羊等大型哺乳類動物的血清為生產來源(Leenaars et al., 1999) ，如常用於提供動物體被動免疫如馬製抗蛇毒血清(Moroz et al., 1966;

Fernandes et al., 1991; Heneine et al., 1998; Maria et al., 1998; Muniz et al., 2000)、馬製抗節肢動物毒素血清(Pepin-Covatta et al., 1996; Braz et al., 1999)等等，或常在多株抗體的重鏈端接上具呈色功能的標籤，如螢光蛋白、山葵過氧化酶（horseradish peroxidase, HRP）、鹼性磷酸酶（alkaline phosphatase, AP）等，針對抗原上各式各樣的表位，做為報導實驗、偵測結果的工具。然而飼養這些動物的空間需求與成本較高；又因為哺乳動物間的親源關係較接近，因此難以用來生產對應哺乳動物保守性蛋白質(conserved proteins)的抗體；此外，對這些動物重複進行侵入性抽血的抗體生產方式，也常受到社會上動物福利團體人士的議論(Chalghoumi et al., 2009)。針對上述的缺點，利用鳥類來生產多株抗體具有替代性的優勢。

三、鳥類的免疫系統

鳥類的免疫系統包括胸腺、法氏囊（bursa of Fabricius）、脾臟、骨髓、哈氏腺（Harderian gland）、淋巴系統等，未成熟 B 細胞在胚胎骨髓、肝臟、蛋黃囊形成，經由血液運輸至法氏囊並分化成為成熟 B 細胞，再轉移至血液、胸線、扁桃腺、骨髓、哈氏腺、脾臟等儲存。法氏囊位於泄殖腔的鄰近位置，在年幼的雞隻體內具有功能，隨著成長而萎縮，性成熟後失去功能(Lillehoj et al., 1993)，若新生雞隻失去法氏囊，即失去自體生產有效抗體的能力，成熟後也不會恢復生成抗

體的能力(Glick et al., 1956)。脾臟是生成記憶型 B 細胞以及 B 細胞分化為漿細胞的場所，當記憶型 B 細胞再遭遇曾入侵個體的免疫原，便會轉化成漿細胞，以快速並大量分泌抗體對抗外來抗原。胸線是 T 細胞成熟的場所，由骨髓生成的幹細胞經血液運輸，在此轉化、成熟為 T 細胞。大多數脊椎動物皆具有哈氏腺的構造，位於眼睛周圍，可分泌液體幫助眼球潤滑，其內含有大量漿細胞，因此可做為鳥類防禦外界病菌入侵的第一線(Bang et al., 1968; Mueller et al., 1971; Wight et al., 1971)。

四、鳥類抗體的多樣性

組成鳥類抗體中輕鏈的 V、J 基因組各只有一個基因片段，限制 VJ 基因重組形成的多樣性，因此在所有 B 細胞形成的輕鏈並無太大差異(Reynaud et al., 1987; Thompson et al., 1987)；重鏈的 V 與 J 基因組也各只有 1 個基因片段(Reynaud et al., 1989)，D 基因組則有 15 個基因片段(Reynaud et al., 1991)，經 VDJ 基因重組後形成的抗體多樣性遠低於老鼠或人類(Ratcliffe, 2006)，然而鳥類的法氏囊中會發生基因轉換（gene conversion）的機制，造成抗體基因的重組現象，進而增加抗體的多樣性：在輕鏈 VJ 和重鏈 VDJ 基因座的 5 端上游各有一群偽基因（pseudogene），由於其核苷酸組成相似於 V 基因，所以

一般使用「ΨV_L」與「ΨV_H」來表示分別屬於輕鏈與重鏈的偽基因，輕鏈約有 25 組 ΨV_L 片段，重鏈則約有 60 至 80 組 ΨV_H 片段，因為其缺乏啟動子與重組訊號序列（recombination signal sequences, RSS）而無法自行轉錄或直接參與 VJ 和 VDJ 基因重組(Reynaud et al., 1987; Reynaud et al., 1989)。當 VJ 的 DNA 片段進行轉錄時（圖二），DNA 解旋酶（DNA helicase）將雙股 DNA 解開，Activation induced cytidine deaminase（AID）會在其中一股 DNA 上隨機將胞嘧啶（cytosine）去除胺基，轉變為尿嘧啶（uridine），使得核苷酸配對錯誤，形成一個缺口(Arakawa et al., 2002; Bransteitter et al., 2003; Dickerson et al., 2003)，該段 DNA 便有機會隨機與偽 V 基因中相似的 DNA 序列雜合，進而將偽基因的 DNA 做為模板，在 DNA 聚合酶作用之下，形成一段新的 DNA，接著此段含偽基因的新 DNA 序列再連結回原本的 VJ 片段，原本的 VJ 片段因為核苷酸錯置而進行修復，產生新的 VJ 基因片段(Ratcliffe, 2006)（圖三），如此隨機發生、進行的機制將大幅提升鳥類抗體的多樣性。

五、鳥類的抗體

(1) 鳥類的抗體介紹

鳥類的血液中存在著 IgY、IgA、IgM 三種抗體類型，以 IgY 的

含量最多，每毫升血清中約含有 5 毫克，IgA 及 IgM 則各為 0.3 及 1.3 毫克(Ratcliffe, 2006)。當鳥類受到免疫刺激後，會大量表現 IgY 以對抗抗原，母體血液中的 IgY 會轉送入蛋黃中，是蛋黃內唯一存在的抗體種類(Chalghoumi et al., 2009)，而蛋白中則僅有些許 IgA 及 IgM 的存在(Rose et al., 1974)。

IgY 抗體的 Fc 端結構與哺乳類免疫球蛋白具有顯著差異，使得 IgY 抗體不會與哺乳類的補體系統（complement system）(Larsson et al., 1992)及 Fc 受體作用(Schmidt et al., 1993)，亦不會與類風濕性因子（rheumatoid factor）作用(Larsson et al., 1991)，因此在分析人體樣品的應用上能減少偽陽性反應的發生；又由於鳥類與哺乳類的親緣關係（phylogenetic distance）差距較大(Akita et al., 1999)，因此鳥類適合用來生產針對哺乳類動物保守性蛋白之對應抗體(Gassmann et al., 1990; Xu et al., 2011)。

(2) IgY 結構與特性

IgY 的分子量約為 180 kDa，研究指出依抗體功能、重鏈蛋白質結構與重鏈蛋白質基因表現情形可視 IgY 為 IgG 與 IgE 的先祖(Warr et al., 1995)，其形狀（如圖一）與哺乳類血清中存在最普遍的 IgG 抗體類似，兩者皆為血清中含量最豐富的抗體，司職最主要的體液免疫防

禦機制，IgY 也同時具有與 IgE 相似的引發過敏性反應的功能。

IgY 由兩條輕鏈與兩條重鏈組成，依功能可區分為變異端（variable region）與恆定端（constant region），變異端在各個抗體分子之間可形成變異，如上述基因轉換的機制，使各抗體具有辨識各式各樣免疫原的能力。IgY 的輕鏈由一個 Variable domain（V_L）與一個 Constant domain（C_L）組成，重鏈則是由一個 Variable domain（V_H）和四個 Constant domain－C_H1、C_H2、C_H3 和 C_H4 組成，C_H2、C_H3 與 C_H4 構成 Fc 端，V_H 和 C_H1 構成 Fab 端，IgY 的 C_H3、C_H4 可分別視為與 IgG 的 C_H2、C_H3 相同的 domain，唯 IgY 的 C_H2 是 IgG 中所缺少的部分。IgG 的結構中具有 hinge region 連接 C_H1 與 C_H2，IgY 則缺乏此一構造，僅在 C_H1 與 C_H2、C_H2 與 C_H3 的相接處藉少數個 proline 與 glycine 進行連接(Chalghoumi et al., 2009)。

IgY 的等電點較 IgG 為低，前者約為 5.7～7.6，後者則為 6.1～8.5(Davalos-Pantoja et al., 2000)。IgY 在 pH 3.5 和 pH 11 的環境中仍能保有與抗原結合的活性，但長時間在 pH 3 以下或是 pH 12 以上，IgY 分子將會因結構發生不可逆的改變而完全失去活性(Chalghoumi et al., 2009)。Hatta et al. (1993)指出胃中的胃蛋白酶（pepsin）會破壞 IgY 抗體結構，使之完全失去與抗原結合能力，但與胰蛋白酶（trypsin 或 chymotrypsin）共存八個小時後，仍能保有約 39～41%的活性。

(3)雞蛋蛋黃中的 IgY

一隻雞在正常情況下，每月可產超過 25 顆蛋(Pauly et al., 2011)。母雞生成雞蛋的過程中，IgY 經由母體的血液循環輸送到卵巢，被濾泡膜上的 IgY 受器結合後，送入蛋黃內堆積、儲存(Cutting et al., 1973; Rose et al., 1981; Tressler et al., 1987)，達到保護發育中的胚胎之功效。雖然此種由母體輸送抗體予胚胎以產生被動免疫的模式與哺乳類相同，但實際參與轉送抗體的受器則並不相同：哺乳類是由 neonatal Fc receptor (FcRn)參與轉送，FcRn 是與 MHC I（class I major histocompatibility complex）有相關性的構造；而雞隻濾泡膜上的 IgY 受器則與 MHC I 非同源，而是與 mammalian phospholipase A2 receptor (PLA2R)較為相似(Tesar et al., 2008)。

每顆雞蛋蛋黃中的 IgY 含量可高達 100 mg (Schade, R. et al., 2005)，因此一隻雞的抗體年產量可高達一隻兔的十數~百餘倍(Hatta et al., 1993)，能有效減少動物使用量，而相較於哺乳類動物，飼養雞隻的所需空間也相對較小、成本花費較低、抗體產量豐富，符合成本、經濟效益的考量，也可免用抽血的方式收集抗體，生產過程更加人道，符合實驗動物福祉要求(Chalghoumi et al., 2009)。

(4) 其他形態的 IgY

IgY 在自然界中有兩種常見形態，除了上述介紹完整形態（full-length IgY），還有一種截短形態的 IgY（truncated IgY）（圖一），缺少完整形態的 C_H3 與 C_H4，分子量約 120 kDa，形狀類似 F(ab')2，因此又被稱作 IgY(△Fc) (Warr et al., 1995)。雞只生產完整形態的 IgY，鴨、鵝及一些爬蟲類的血清中則是兩種形態的 IgY 皆存在，某些烏龜以及肺魚只生產截短形的 IgY(Grey, 1967; Leslie et al., 1969; Chartrand et al., 1971; Zimmerman et al., 1971; Leslie et al., 1972; Magor et al., 1992; Fellah et al., 1993; Magor et al., 1994; Warr et al., 1995)，此種抗體被認為會參與 B 細胞的抗原內化等防衛機制，但無法參與補體固定作用（complement fixation）、調理作用（opsonization）、抗體依賴型吞噬細胞毒殺作用（antibody dependent cellular cytotoxicity）以及紅血球凝集抑制作用(Warr et al., 1995)等。

六、蛋黃 IgY 的應用

IgY 在目前的應用中主要以多株抗體的形式發揮作用，因此常見用於基礎研究、醫事檢驗、與醫藥治療等領域(Cai et al., 2009; da Silva et al., 2010; Xu et al., 2011)，如具抗蛇毒效果的 IgY 可提供動物體被動免疫的效果(Michael et al., 2010)，中和蛇毒毒性，降低受毒蛇攻擊的死亡率；近來也生產針對沙門氏桿菌（*Salmonella*）、空腸彎曲桿菌（*Campylobacter jejuni*）、大腸桿菌（*Escherichia coli*）、輪狀病毒

（Rotavirus）、冠狀病毒（Coronavirus）等病原體的 IgY，經由口服或注射的方式行被動免疫，減少動物體發生腹瀉、發燒，甚至是死亡的情形(Chalghoumi et al., 2009)；也有養殖業者在飼料中添加對應病原體的 IgY 以對水產生物進行被動免疫而達到保護的效果，並可減少抗生素與其他化學性藥物的使用，讓消費者能安全無虞地食用(Wu et al., 2011; Xu et al., 2011)；針對幽門螺旋桿菌（*Helicobacter pyroli*）尿素酶的雞隻 IgY，可抑制幽門螺旋桿菌的尿素酶（urease）的作用，降低菌體附著到胃壁及引發發炎、潰瘍等症狀的機會(Shin et al., 2004; Nomura et al., 2005; Attallah et al., 2009)，將此 IgY 抗體添加在食品進行臨床測試，確實可讓人體內的幽門桿菌數減少，達到治療或預防的功效(Horie et al., 2004)；針對引發口腔疾病的變形鏈球菌（*Streptococcus mutans*）與牙周炎致病菌（*Porphyromonas gingivalis*）的 IgY 則可有效防治齲齒及牙周病。除了大量醫事上的應用，日常生活中亦可以 IgY 做為快速篩檢尿液中嗎啡的工具(Gandhi et al., 2009)，以及抑制腐敗細菌生長，延長海鮮類食物存放時間(Xu et al., 2012)等等。

七、IgY 萃取方法

當雞隻受免疫刺激後，隨著時間演進及注射次數增加，蛋黃中對

應抗原專一的 IgY 含量會逐漸增加，此時只要每日收集雞蛋，即可分離出蛋黃液以進行 IgY 萃取，然而蛋黃中含有水份 48%、蛋白質 17%以外，另有高達 34%的脂質(Li-Chan et al., 2007)，且大部分脂質皆以非水溶性的脂蛋白形式存在，不利於萃取及純化 IgY，也易對後續應用產生干擾，因此去除脂質為萃取 IgY 的一重要關鍵。IgY 無法與 protein A/G 結合則為另一個純化上的難題：protein A/G 吸附管柱層析法是常用於純化哺乳類動物免疫球蛋白工具，藉由各式免疫球蛋白 Fc 端與 protein A 或 protein G 結合，而能純化幾乎各式哺乳類抗體，但由於 IgY 的 Fc 端氨基酸組成與哺乳類抗體的差異明顯，因此無法與 protein A/G 上的結合位產生鍵結，遂無法以 protein A/G 層析法純化 IgY 抗體(Kronvall et al., 1974; Akerstrom et al., 1985; Schade, R. et al., 2005; Cai et al., 2009)。

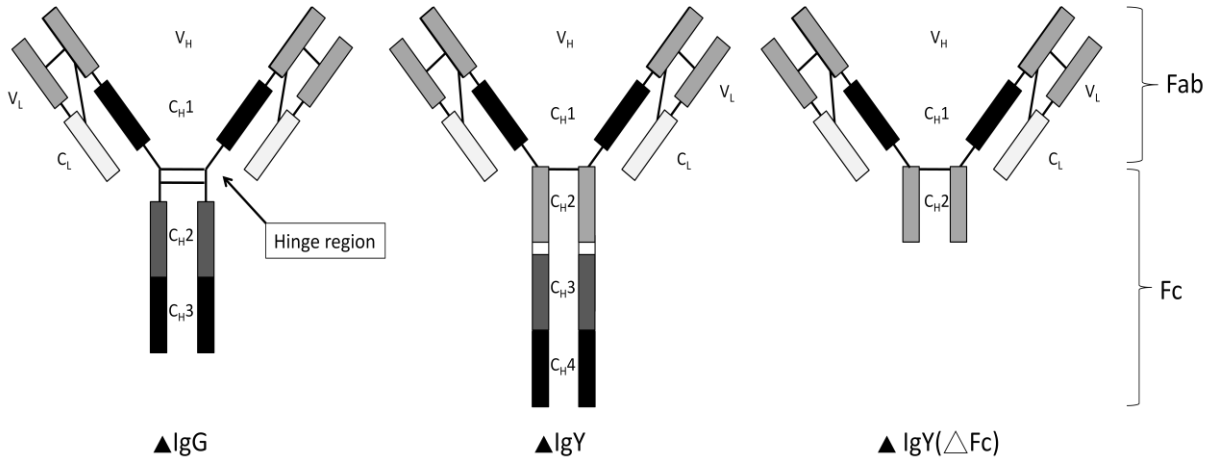
現有的蛋黃 IgY 萃取方法，都以去脂(delipidation)步驟開始，包括水稀法(Akita et al., 1992, 1993)、PEG 沉澱法(Polson et al., 1980; Polson et al., 1985)、氯仿沉澱法(Ntakarutimana et al., 1992)、膠液沉澱法(Hatta et al., 1990; Chang et al., 2000; Tan et al., 2012)等；隨後再藉鹽析沉澱(Pour-Amir et al., 2000; Ruan et al., 2005; Araujo et al., 2010)、或過濾法(filtration) (Maya Devi et al., 2002; Hernandez-Campos et al., 2010)、或離子交換管柱(Meenatchisundaram et al., 2008a, b)、或親硫

性管柱(Cook et al., 2001; Ortiz-Bueno et al., 2009)、或吸附管柱(Brunda et al., 2006; Paul et al., 2007; Qu et al., 2011)將 IgY 進一步分離純化。由於水稀法(Akita et al., 1992, 1993)的步驟簡便，藉弱酸性的水稀釋蛋黃，即可達到分離水溶蛋白與脂質的效果，因此目前較被廣泛採用(Akita et al., 1992, 1993; Svendsen et al., 1995; Pour-Amir et al., 2000; Verdoliva et al., 2000; Maya Devi et al., 2002; Sunwoo et al., 2002; Bizhanov et al., 2004; Ruan et al., 2005; Klimentzou et al., 2006; Chalghoumi et al., 2008; Palaniyappan et al., 2012)。近期 Tan et al. (2012)研發出先以含果膠（gum pectin）、卡拉膠（κ-carrageenan）和氯化鈣（$CaCl_2$）的溶液進行蛋黃的去脂作用，再搭配硫酸銨的重複沉澱步驟，可於 5h 內從 1 顆蛋黃中分離得到 60 mg 純度達 80%的 IgY 樣品，可視為快速、經濟、並且有效萃取 IgY 的典例。

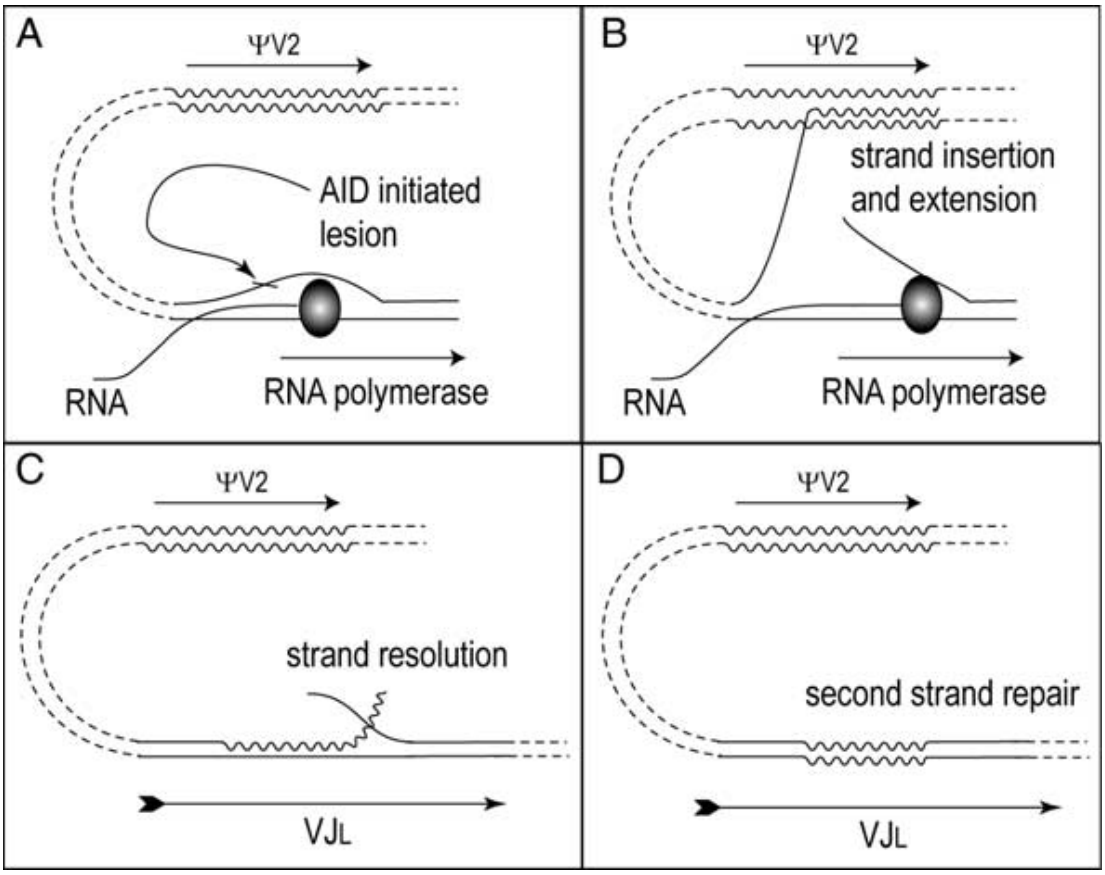
八、研究目的

由哺乳動物生產的抗體目前已被廣泛應用於基礎研究、醫學檢驗等生活中的許多領域，而由雞蛋蛋黃生產 IgY 的優點繁多，足以取代哺乳類動物的血清做為抗體生產來源，但目前缺少適當的蛋黃 IgY 分離方法，因此 IgY 的使用仍不夠普遍。本研究之目的即在於發展一快速、有效的蛋黃 IgY 萃取方法，將有助於 IgY 之應用與推廣。此外，目前也缺乏適切的專一性 IgY 純化方法，我們實際對雞隻進行免疫注

射以生產專一性抗體，再利用由重組蛋白製備的吸附管柱進行純化，製備純度、效價及專一性皆優良的 IgY 樣品，達到提升 IgY 應用價值之目的。

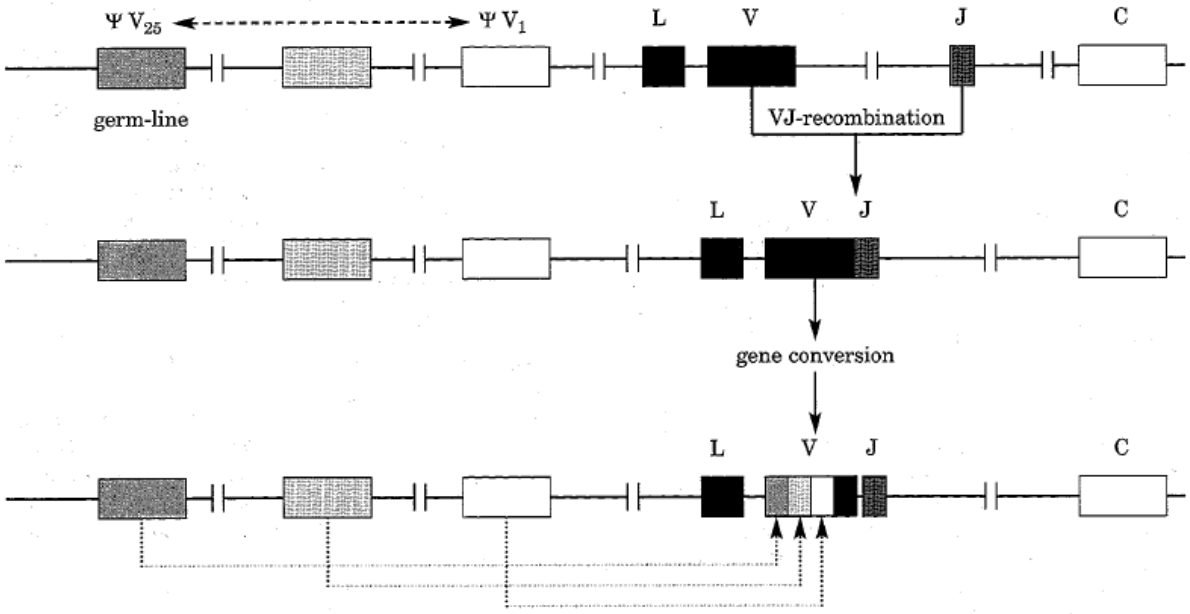


圖一、IgG、IgY、IgY(△Fc)的結構比較圖。



圖二、基因轉換的可能機制。本圖引用自 Ratcliffe (2006)。

DNA 解旋酶（DNA helicase）將 DNA 解開成單股，AID 則在其中一股 DNA 上製造一個缺口（A），不受結構限制的 DNA 單股便有機會與偽 V 基因中的 DNA 序列雜合，並將之做為模板，形成一段新的 DNA（B），此段含偽基因的新 DNA 序列再連結回原本的 VJ 片段（C），原本的 VJ 片段則進行修復，產生新的 VJ 基因片段（D）



圖三、基因轉換過程示意圖。本圖引用自 Schade et al. (2005)。

原始 VJ 基因片段在轉錄的過程中，隨機遭遇偽基因片段，以偽基因片段為模板進行 DNA 複製後，插入原始 DNA 之中，而能產生新的 VJ 基因片段，使雞隻生產的抗體不受原始 V、J 基因片段數量的限制，而能有效提升抗體多樣性。

第二章 快速、有效與低成本的蛋黃 IgY 萃取方法

(A rapid, effective and inexpensive extraction method for yolk IgY)

第一節 摘要

雞蛋的蛋黃中含有高量 IgY，是多株抗體的良好來源；然而蛋黃中亦含有豐富的脂質和其他多種蛋白質，易造成 IgY 純化與應用的干擾。為方便化與普及化蛋黃 IgY 的應用，研發適當的萃取方法有其必要性。

本研究發現醋酸鈉溶液（0.1 M ; pH 5.0）具有良好的蛋黃去脂效果，相較於常見的酸水稀釋法需要作用 6 h 或更久時間，醋酸鈉溶液僅需反應 0.5 h 即可分離得到 IgY 含量超過 30%的粗萃液，並能直接應用於多種免疫化學試驗。進一步的鹽析沉澱結果則顯示，粗萃液中分別添加硫酸銨至 30%、40%、50、和 60%飽和度時，IgY 的沉澱回收率為 48%、69%、90%、及 96%，而回收樣品的 IgY 純度則分別為 90%、83%、66%、及 53%，此項結果可做為參考，供各實驗室依後續用途對 IgY 產率和純度的要求，而選擇沉澱 IgY 的適當硫酸銨添加量。

是以本研究所開發的蛋黃 IgY 萃取方法是先利用醋酸鈉溶液進行去脂作用，再藉硫酸銨鹽析沉澱 IgY。此一兩步驟的簡單方法，可

於 2h 內從一顆蛋黃中分離得到近 90 mg 純度超過 80%的蛋黃 IgY 樣品。相較於現有的 IgY 萃取方法，本研究所開發的方法不僅步驟最為簡單、快速，蛋黃 IgY 的回收率與純度亦佳，試劑成本更是低廉，且無需使用任何有機溶劑，較能符合環保要求。本方法除了可供一般實驗室的例行 IgY 萃取使用之外，亦可被應用於產業界之大規模 IgY 生產目的。

第二節 緒言

脊椎動物的免疫系統遭遇外來特定抗原（antigen）後，常會誘發體內產生多種辨識該抗原不同表位（epitopes）的抗體分子，這些抗體分子的集合統稱為多株抗體（polyclonal antibodies）。由於抗體與其辨識的抗原表位間常具有強結合力（binding affinity）與高專一性（specificity），故可被應用於特定抗原分子的鑑定、分析與純化等多種用途，目前已是基礎研究、一般檢驗、與醫藥治療的重要工具(Lipman et al., 2005; Newcombe et al., 2007)。由於動物體內被誘發表現的抗體多分布於血液之中，故多株抗體的生產上，通常會選用中、大體型的兔和羊等動物(Leenaars et al., 1999; Michael et al., 2010)；不利之處是這些動物的空間需求與飼養成本較高；又因為哺乳動物彼此間的親源關係較接近，這些動物也不適合用來生產對應哺乳動物保守性蛋白質（conserved proteins）的抗體；此外，對這些動物重複進行侵入性抽血的抗體生產方式，也常受到社會上動物福利團體人士的議論(Chalghoumi et al., 2009)。

針對上述的缺點，利用雞蛋的蛋黃（egg yolk）來生產多株抗體具有替代性的優勢。雞隻（*Gallus gallus*）受到免疫刺激後產生的抗體分子以 IgY 為主，IgY 不僅是雞血中含量最豐富的抗體分子，也是蛋黃中唯一存在的抗體種類(Chalghoumi et al., 2009)。由於雞隻的飼

養成本較兔、羊等動物便宜，產蛋效率又高（正常情況下，每月可產≥25 顆蛋）(Pauly et al., 2011)，且每顆蛋黃的 IgY 含量可高達 100 mg (Schade, R. et al., 2005)，甚至比雞血中的 IgY 濃度更高(Larsson et al., 1993)，因此一隻雞經由蛋黃的抗體年產量可高達一隻兔的十數~百餘倍(Hatta et al., 1993)；再者，因為雞蛋的收集較採血更為方便與人道(Schade, R. et al., 2005)，除了可以提供更穩定的抗體來源之外，亦可減少動物福利團體人士的爭議。

除了上述的優點之外，鳥類與哺乳類之間有一定的親緣距離，因此成功產生對應哺乳動物保守性蛋白質之抗體的機會較高(Gassmann et al., 1990)；又 IgY 與哺乳類的 IgG 分子在 Fc 部位的序列上有顯著差異，故 IgY 不會與哺乳類的補體（Complement）、類風濕因子（Rheumatoid factor）及 Fc 受體（Fc receptor）等發生作用，可減少對人類血清進行檢驗或其他分析時的背景反應與干擾(Larsson et al., 1991; Larsson et al., 1992)。

雖然在多株抗體的生產與應用上，IgY 較 IgG 具有更多的優點，但目前 IgY 的使用仍不夠普遍，其中主要的限制因素是缺少適當的蛋黃 IgY 分離方法（步驟簡單快速、IgY 回收量與純度良好、成本花費便宜）(Tan et al., 2012)，尤其蛋黃中含有脂質高達 34％(Li-Chan et al., 2007)，對 IgY 的純化工作常造成嚴重干擾(Hansen et al., 1998)。此外，

由於 IgY 與 IgG 在 Fc 部位的胺基酸序列差異，也使得廣泛應用於純化 IgG 的 protein A/G 管柱並無法被用來吸附分離 IgY(Kronvall et al., 1974; Akerstrom et al., 1985; Cai et al., 2009)。

現有的蛋黃 IgY 萃取方法，都以去脂（delipidation）步驟開始，包括水稀法(Akita et al., 1992, 1993; Ruan et al., 2005))、PEG 沉澱法(Polson et al., 1980; Polson et al., 1985; Prabhu et al., 2010)、氯仿沉澱法(Ntakarutimana et al., 1992)、膠液沉澱法(Hatta et al., 1990; Chang et al., 2000; Tan et al., 2012)等；隨後再藉鹽析、或過濾、或離子交換管柱、或吸附管柱、或前述方法的不同組合將 IgY 進一步純化(Schade, R. et al., 2005)。由於這些過程通常步驟繁瑣且耗時相當冗長，因而對 IgY 應用的方便化和普及化不甚有利。是以，本研究之目的即在試圖開發一快速、有效的蛋黃 IgY 分離方法，俾使能對 IgY 之應用與推廣能有提升的助益。

第三節 材料與方法

1. 蛋黃的收集

本研究所使用的雞蛋來源為實驗室自行飼養的白色萊亨蛋用雞（White Leghorn laying hens；50～52 週齡）。蛋殼敲破後，將分離的蛋黃置於不鏽鋼濾網中，再將濾網浸入裝有 ddH_2O 的燒杯中，以洗去蛋黃表面殘留的蛋白液，隨後以紙巾從濾網外側將多餘的水分吸乾，再用解剖針搓破蛋黃膜，並以量筒收集蛋黃液。本實驗使用的雞蛋其蛋黃液體積約為 13～15 mL。

2. 蛋黃 IgY 的粗萃取

取定量體積的蛋黃液，加入其 9 倍體積的萃取試劑〔酸水(Akita &Nakai, 1992)或本研究採用的 0.1M 醋酸鈉溶液〕，混合均勻後，置於 4℃ 中攪拌反應，隨後進行離心（12,000×g，30 min，4℃），而收集到的上清液（supernatant）即為蛋黃的粗萃液（crude extract），量測體積後，加入 NaN_3 至最終濃度為 0.02%（w/v），並保存於 4℃ 中供後續分析使用。

3. 蛋黃 IgY 的硫酸銨鹽析沉澱

將蛋黃液先以 0.1 M 醋酸鈉溶液（pH 5.0）進行上述的粗萃取過程（4℃ 攪拌時間為 0.5 h)，再取 4 等份粗萃液（各 10 mL），分別添

加硫酸銨（ammonium sulfate; Merk 1.01217）至 30%、40%、50%、和 60%四種不同飽和程度，經於 4℃中攪拌 30 分鐘後，離心（12,000×g, 4℃）30 分鐘，再分別以 1 mL PBS 溶液（配方見附註）回溶沉澱（pellet），經澄清後加入 0.02%（w/v）NaN_3，並保存於 4℃中。

4. SDS 膠體電泳分析（Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE）

本研究採用 Laemmli (1970)的方法進行 SDS-PAGE 分析（4% stacking gel, 12% separating gel；配方見附錄三）。電泳的條件為固定 120V 約 2.5 h。電泳後，將膠片取下搖盪浸泡於 CBB 染劑（配方見附錄三）中 1 小時以上，隨後以一級褪染液（配方見附錄三）褪染 10～20 分鐘，再以二級褪染液（配方見附錄三）褪染至蛋白質色帶清晰可見且背景透明為止。

5. 蛋黃 IgY 的定量分析

本研究藉酵素連結免疫吸附法（enzyme-linked immuno-sorbent assay; ELISA）來測定分析樣品中的 IgY 含量。首先將 IgY 標準品（Jackson，003-000-003）與待測樣品分別以 0.2 M borate saline（配方見附錄四-1）進行一系列稀釋，再各取 50 μL 分注至 ELISA plate（Costar EW-01959-20）的樣品孔中，經 6 h（RT）或 overnight（4℃）

的吸附作用後，以 Wash buffer（配方見附錄四-1）沖洗 ELISA plate 三次，隨後於各樣品孔加入 180 μL Blocking buffer（配方見附錄四-1），並將 ELISA plate 靜置於室溫下（2h）或 4℃中（overnight）；之後，將 ELISA plate 沖洗三次，並於各孔加入 50 μL rabbit anti-chicken IgY（Jackson，303-005-003；1 μg/ml），在室溫下反應 2h 後，沖洗 ELISA plate 三次，再於各孔中加入 50 μL goat anti-rabbit antibody-alkaline phosphatase（Sigma，A3687；使用 10,000 倍稀釋液），隨後經 2h 反應（RT）及三次沖洗後，各孔分別加入 50 μL pNPP 受質（配方見附錄四-1）並進行 30-60 min 的呈色反應，最後以 ELISA reader（BIO-TEK MQX220）測定吸光值（$OD_{405-490}$）。在同一次的實驗中，將系列稀釋的 IgY 標準品讀值，取其直線變化範圍做成標準曲線，可用以推估待測樣品的 IgY 含量。

6. 蛋白質定量

本實驗藉 Bradford assay(Bradford, 1976)來估測分析樣品中的蛋白質含量，並以 bovine serum albumin（Sigma，A7906）做為蛋白質標準品。先將 BSA（2 mg/mL）與待測樣品進行系列稀釋，並各取 50 μL 分別加注於 96 孔盤中，隨後各孔加入 200 μL Bradford reagent（配方見附註），靜置十分鐘後，以 ELISA reader 測定 $OD_{595\ nm}$ 的讀值。取 BSA 系列稀釋樣品的讀值做一標準曲線，可用以估算待測樣品的

蛋白質濃度。

7. 統計分析

本研究對兩兩比較的實驗結果，是以 Student’s T- test 來分析其是否具顯著差異；對多組比較的實驗結果，則是以單因子變異數分析（ANOVA）來檢測組間的差異性，並以 $p< 0.05$ 做為顯著的標準。

第四節 結果

1. 蛋黃萃取溶液的測試

IgY 是蛋黃中的可溶性成分，為能萃取蛋黃中的 IgY，目前學界最常使用水稀法(Akita et al., 1992)：即先將蛋黃以酸水（pH 5.0～5.2）進行稀釋，再經長時間（6h~overnight）的低溫（4℃）攪拌後，離心去除蛋黃的「非水溶性」成分。由於酸水並非良好的酸鹼緩衝試劑，本研究遂以 0.1 M 醋酸鈉溶液（pH 5.0）取代酸水。

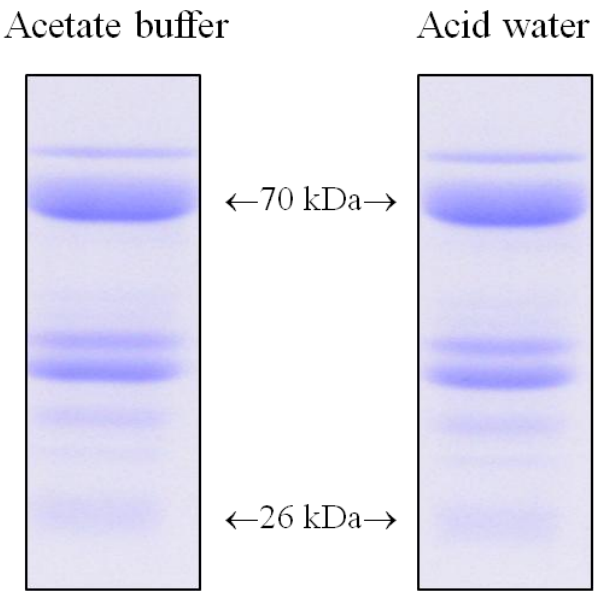
為比較兩種試劑對蛋黃 IgY 萃取效果的差異，我們取兩份等體積蛋黃（各 5 mL），分別加入 9 倍體積的酸水或醋酸鈉溶液，經於 4℃下攪拌 6 小時後，離心沉澱去除「非水溶性」成分，再將收集到的粗萃液藉 Bradford assay 測定其蛋白質含量，也進行 ELISA 實驗以分析其 IgY 含量。

表一結果顯示，每 10 mL 酸水粗萃液（源自 1 mL 蛋黃液）中的蛋白質含量為 23.5 ± 1.3 mg，與醋酸鈉粗萃液的 23.4 ± 1.4 mg 並無顯著差異；而兩者的 IgY 含量則皆在 7.2～8.0 mg 之間，亦無統計上的差別。為確認上述的結果，我們將兩種粗萃液進行 SDS-PAGE 及 CBB 染色分析，圖一結果顯示兩種粗萃液中的蛋白質種類與個別含量均無可區辨的差異（no discernible difference）。

表一：兩種蛋黃粗萃取液的比較。

	Acetate buffer	Acid water
IgY (mg) / mL yolk	7.2 ± 0.9	8.0 ± 1.3
Protein (mg) / mL yolk	23.4 ± 1.4	23.5 ± 1.3

表中數值為三次重複實驗結果的平均值與標準差。經 t-test 分析二組處理間並無顯著差異（$p > 0.05$）。



圖一、兩種蛋黃粗萃液的蛋白質電泳分析結果。

將兩種蛋黃粗萃液（Acetate buffer 或 Acid water）各取約 8 μg 蛋白質進行 12% SDS-PAGE，隨後進行 CBB 染色。圖中的上、下方箭頭分別標記 IgY 的 H chain（70 kDa）及 L chain（26 kDa）之位置。

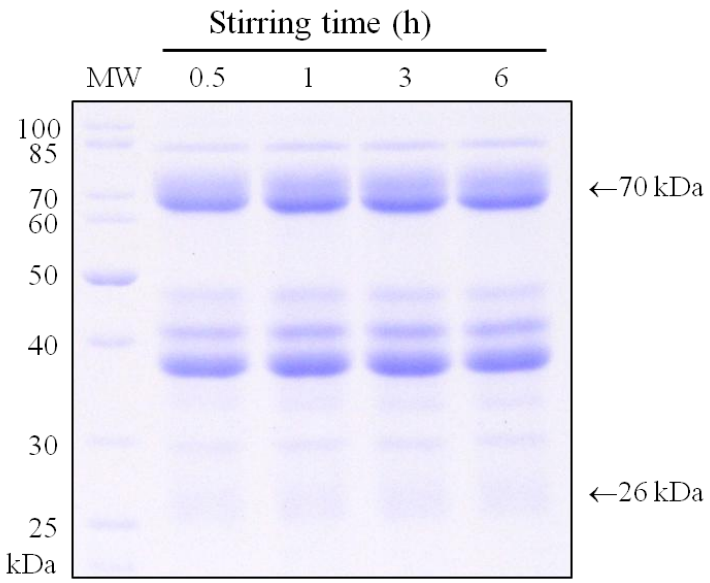
2. 粗萃取蛋黃 IgY 的攪拌時間測試

上述的實驗結果（表一、圖一）顯示，醋酸鈉溶液（0.1M , pH 5.0）具有與酸水相似的 IgY 萃取效果。為檢視能否提升 IgY 萃取的時效，本研究於是探討以醋酸鈉溶液為萃取試劑時，不同攪拌時間對 IgY 萃取效果的影響。表二的數據顯示，四種不同攪拌時間（0.5 h、1 h、3 h、6 h）的處理下，每毫升蛋黃所能萃得的 IgY 含量（6.0～7.2 mg）及蛋白質含量（21.7～24.9 mg），經 ANOVA 分析後（$p > 0.05$）並無統計上的差異，而 SDS-PAGE 的實驗結果（圖二）也證實，四種樣品中的蛋白質種類與個別含量亦無明顯不同。此一結果顯示，在以醋酸鈉溶液為蛋黃的萃取試劑時，0.5h 的低溫攪拌時間即可達到充分的萃取效果。

表二、低溫攪拌時間對蛋黃 IgY 及蛋白質的萃取效果比較。

Stirring time (h)	0.5	1	3	6
IgY (mg) / mL yolk	6.9 ± 2.0^{a}	7.2 ± 1.7^{a}	7.2 ± 1.8^{a}	6.0 ± 1.1^{a}
Protein (mg) / mL yolk	24.9 ± 1.1^{b}	22.7 ± 0.9^{b}	21.7 ± 1.6^{b}	23.1 ± 1.4^{b}

表中數值為四次重複的平均值與標準差。同一列數值的上標英文字母相同時，代表各處理間無顯著差異（$p > 0.05$），若上標的英文字母相異時，則表各處理間具有顯著差異（$p < 0.05$）。



圖二、不同攪拌時間的 IgY 萃取效果比較。

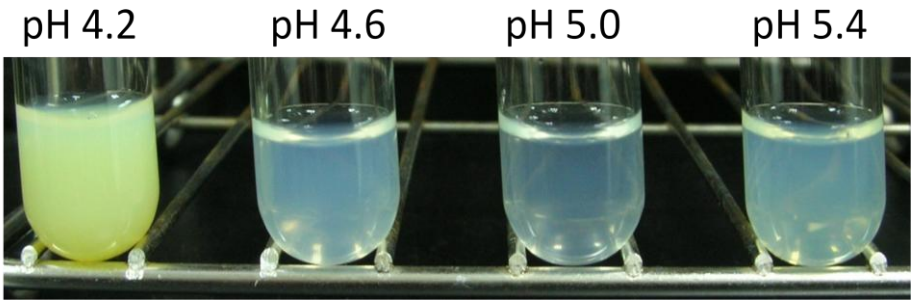
將四種不同低溫攪拌時間（0.5、1、3、6 小時）的蛋黃粗萃液，各取 8 μg 蛋白質進行 12% SDS-PAGE 與 CBB 染色的結果。圖右箭頭分別標記 IgY 的 H chain（70 kDa）及 L chain（26 kDa）位置。MW 則為蛋白質分子量標準品（Bioman，PL01425）。

3. pH 值對蛋黃 IgY 的萃取效果探討

本研究也檢視醋酸鈉溶液的 pH 值對 IgY 萃取效果之影響。我們配製 pH 值為 4.2、4.6、5.0、及 5.4 的四種 0.1 M 醋酸鈉溶液，再分別用以進行蛋黃 IgY 的粗萃取過程（10 倍稀釋；0.5 h 低溫攪拌時間），經離心處理後，四種不同 pH 條件的蛋黃粗萃液在外觀上有明顯差異（圖三）：pH 4.2 的粗萃液最為黃濁，其次為 pH 5.4 的粗萃液，而 pH 5.0 的粗萃液則相對最為清澈。由於蛋黃萃取液的黃濁顏色主要受非水溶性脂質含量的影響(Smith et al., 1966)，故可推知醋酸鈉溶液的去脂效果是為 pH-dependent 的反應。

我們也將上述四種不同 pH 條件的蛋黃粗萃液，進行 IgY 及蛋白質含量的分析。表三顯示四種蛋黃粗萃液之間的 IgY 含量並無顯著不同（每 10 mL 粗萃液的 IgY 含量為 8.7～9.2 mg），但蛋白質含量則有明顯差異，並似乎與粗萃液的濁度成正相關：每 10 mL 最黃濁的粗萃液（pH 4.2）中，蛋白質含量約為 63 mg；同體積最清澈的粗萃液（pH 5.0）中，蛋白質含量則僅約為 27.6 mg。若以 IgY 含量與蛋白質含量的比值來代表為萃取樣品的 IgY 純度（purity)，則四種不同 pH 條件的粗萃液中，IgY 的純度依序為 32.6%（pH 5.0）、30.6%（pH 4.6）、21.6%（pH 5.4）、和 14.7%（pH 4.2）；統計分析的結果顯示，前兩者的純度並無明顯不同，但其與後兩者之間則有顯著差異。

為確認表三的結果，我們也將上述四種不同 pH 條件的蛋黃粗萃液進行電泳分析。圖四的結果顯示，在等蛋白質量的基準下，pH 4.2 的粗萃液中，蛋白質的種類明顯最多，IgY 的含量（根據 H chain 及 L chain 的染色密度）也相對較少；而在 pH 5.0 與 pH 4.6 的粗萃液中，蛋白質的種類則較少，IgY 的含量也較高，是以電泳分析的結果與表三的資料符合一致。

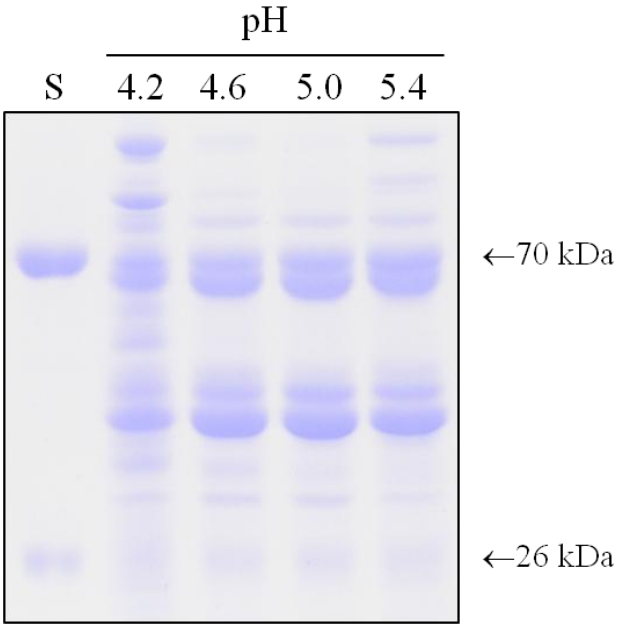


圖三、不同 pH 條件的蛋黃粗萃液之外觀情形。

表三、不同 pH 條件下，蛋黃粗萃液的 IgY 與蛋白質含量比較。

Acetate buffer	pH 4.2	pH 4.6	pH 5.0	pH 5.4
IgY (mg) / mL yolk	9.2 ± 0.7^{a}	8.7 ± 1.8^{a}	9.2 ± 1.1^{a}	8.7 ± 1.9^{a}
Protein (mg) / mL yolk	63.6 ± 2.2^{b}	26.4 ± 0.6^{c}	27.6 ± 2.5^{c}	39.3 ± 0.7^{d}
IgY purity (%)	14.7 ± 1.1^{e}	30.6 ± 6.0^{f}	32.6 ± 2.5^{f}	21.6 ± 5.1^{g}

表中數值為三次重複實驗結果的平均值與標準差。在同一列資料中，上標的英文字母相同時，代表各處理間無顯著差異；相異時則表處理間具有顯著差異。四組蛋黃粗萃取液中的 IgY 含量經 ANOVA 分析（$p > 0.05$）並無顯著差異，而蛋白質含量則有顯著差異（$p < 0.05$）；蛋白質含量的資料隨後再以 t-test 交叉分析組間的差異情形。



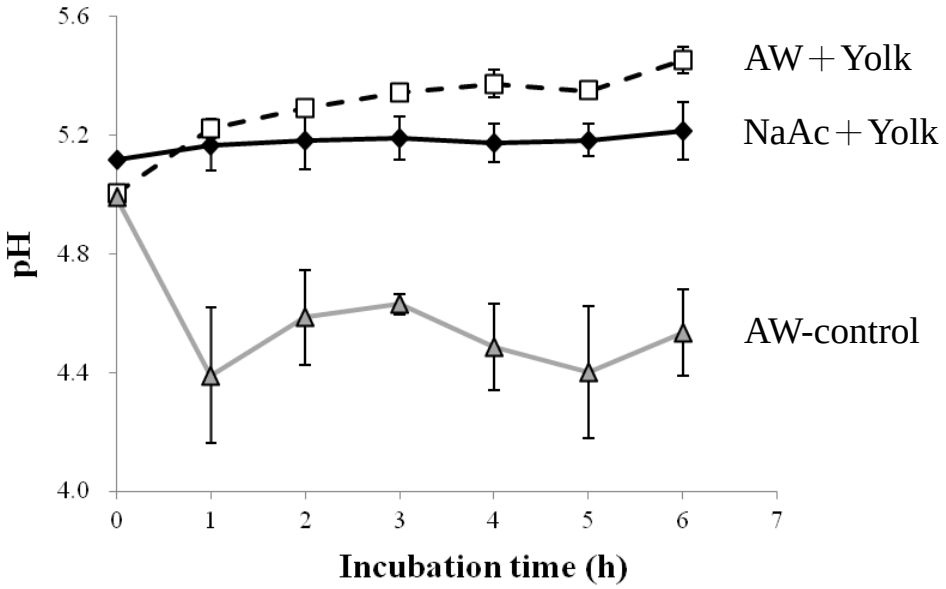
圖四、將不同 pH 條件之蛋黃粗萃液進行電泳分析的結果。

將蛋黃分別以 pH 4.2、pH 4.6、pH 5.0、pH 5.4 的 0.1M 醋酸鈉溶液進行粗萃取過程後，各取 12 μg 蛋白質進行 12% SDS-PAGE，再以 CBB 染色。「S」表示 IgY 的標準樣品（3 μg）。圖右的箭頭指示 IgY 的 H chain（70 kDa）及 L chain（26 kDa）位置。

4. 蛋黃稀釋液於攪拌期間的 pH 值變化情形

為探討蛋黃粗萃液的去脂過程與氫離子的關係，我們將蛋黃與萃取液混合後在低溫（4℃）下攪拌，隨時間檢測其酸鹼值的變化情形。本實驗設計共分成 3 組：第一組取定量蛋黃，加入 9 倍體積的 0.1M 醋酸鈉溶液(pH 5.0)，稀釋樣品的初始 pH 值為 5.1（醋酸鈉稀釋組）；第二組取與第一組同量的蛋黃，並加入 9 倍體積的二次水，稀釋樣品的初始 pH 值為 6.2，我們旋即加入少量 0.1 N HCl（<2%總體積）使其 pH 值調整為 5.0（酸水稀釋組）；第三組為單純二次水，並加入少量 0.1 N HCl 使其 pH 值調整為 5（酸水對照組）。三組樣品完成製備後，移入 4℃中進行攪拌，並隨時間進展檢測其酸鹼值的變化情形。

結果如圖五所示，在總共 6 小時的攪拌期間，「醋酸鈉稀釋組」樣品的 pH 值恆定維持在 5.1 範圍；「酸水稀釋組」樣品的 pH 值則是逐漸上升至 5.4；而「酸水對照組」的 pH 值則於攪拌初期（1h）即迅速下降至 4.4，隨後維持於該 pH 值範圍。



圖五、蛋黃稀釋液於攪拌期間的 pH 值變化情形。

取兩份等體積之蛋黃，分別以醋酸鈉溶液（醋酸鈉稀釋組，NaAc＋Yolk）及二次水稀釋蛋黃（酸水稀釋組，AW＋Yolk），後者再用 0.1 N HCl 調整 pH 值至 5.0；另以 0.1 N HCl 與二次水配製成 pH 5.0 的酸水（酸水對照組，AW－control）做為對照，三組樣品完成製備後，移入 4℃中進行攪拌，並隨時間進展檢測其酸鹼值的變化情形。圖中數值皆為三次重複所得平均值及標準差。

5. 蛋黃粗萃液的硫酸銨鹽析沉澱測試

為進一步純化蛋黃粗萃液（0.1M 醋酸鈉溶液，pH 5.0；0.5 h 低溫攪拌時間）中的 IgY 成分，本研究於是進行硫酸銨鹽析沉澱試驗：我們將蛋黃粗萃液分別添加硫酸銨至不同的飽和程度（30%、40%、50%及 60%），經 30 min 攪拌反應及離心沉澱後，回溶並分析鹽析產物的 IgY 與蛋白質含量。

表四的結果顯示，蛋黃粗萃液中的硫酸銨飽和程度越高，蛋白質及 IgY 的沉澱量亦隨之增加：在 30%飽和度的條件下，每 10 mL 蛋黃粗萃取液可沉澱出 4.9 mg 蛋白質，其中 4.4 mg 為 IgY；在 60%飽和度的條件下，同體積的蛋黃粗萃取液則可沉澱出 16.9 mg 蛋白質，包含 8.9 mg IgY。此一結果顯示在不同硫酸銨飽和度的條件下，蛋白質與 IgY 的沉澱量並非以等比例的形式變化，故硫酸銨的添加量除了會影響 IgY 的回收率之外，亦會影響各回收樣品的 IgY 純度（IgY/protein）：在 30%硫酸銨的飽和度條件下，IgY 的回收率雖只有 48%，但純度卻高達近 90%；在 60%硫酸銨飽和度的條件下，IgY 的回收率雖可高達 96%，但純度則減至 53%。

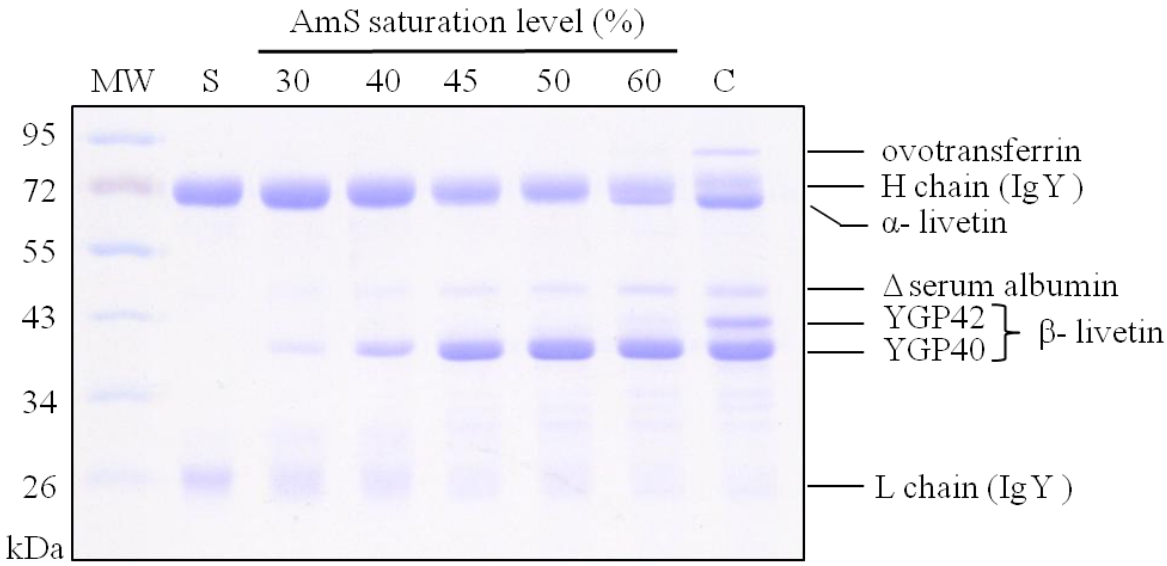
為驗證表四的結果，我們也將不同硫酸銨飽和度的鹽析沉澱樣品，取等量蛋白質進行電泳分析，結果（圖五）可見 30%飽和度的沉澱樣品其 IgY 純度最高，僅含有些許β-levetin 及Δ serum albumin，隨著

硫酸銨飽和度的增加，沉澱的蛋白質種類亦隨之增多，而 IgY 的純度則隨之遞減，此一結果與表四的數據相符合。

表四、蛋黃粗萃液的鹽析沉澱結果。

		AmS saturation level			
	per mL yolk	30%	40%	50%	60%
Protein content (mg) (Recovery)	28.3 ± 1.2^{a} (100%)	4.9 ± 0.7^{b} (17%)	7.6 ± 0.3^{c} (27%)	12.6 ± 0.6^{d} (45%)	16.9 ± 1.6^{e} (60%)
IgY content (mg) (Recovery)	9.2 ± 0.7^{f} (100%)	4.4 ± 0.6^{g} (48%)	6.3 ± 0.8^{h} (69%)	8.3 ± 0.4^{i} (90%)	8.9 ± 0.6^{i} (96%)
IgY purity (%)	32.5 ± 1.9^{j}	89.7 ± 2.1^{k}	82.8 ± 7.2^{l}	65.8 ± 4.0^{m}	53.1 ± 6.5^{n}

表中數值為三次實驗結果的平均值與標準差。統計處理時首先進行 ANOVA 分析，若組間具有差異，則再進行 t-test 交叉分析組間的差異情形。同一列內的上標英文字母相同時，代表各處理間無顯著差異（$p > 0.05$）；相異時則表個處理間具有顯著差異（$p < 0.05$）。



圖六、蛋黃粗萃液的鹽析產物電泳分析結果。

將蛋黃粗萃液（C）及其不同硫酸銨飽和程度的沉澱樣品（30%～60%），各取 3 μg protein 進行 12% SDS-PAGE 與 CBB 染色。「S」表示 IgY 的標準品（Jackson，003-000-003）。圖右的箭頭標示蛋黃中各特定蛋白質的位置。MW 為蛋白質分子量標準品。

第五節 討論

蛋黃的成分中，水分占 48%、脂質占 34%、蛋白質則為 17% (Li-Chan et al., 2007)。由於蛋黃中的大部分脂質會與特定蛋白質聚集形成脂蛋白顆粒（lipoprotein granules：HDL & LDL）並散佈於親水性的漿液（plasma）中，故蛋黃的組成也常被區分為疏水性的顆粒部分（granule fraction）及親水性的漿液部分（plasma fraction）(Kovacs-Nolan et al., 2005)。在親水性的漿液中，蛋黃球蛋白（livetin）是最主要的蛋白質種類，約占蛋黃乾重的 10%(Anton, 2007)；蛋黃球蛋白包含 70 kDa 的 serum albumin（α-livetin）、45 kDa 的 α-2-glycoprotein（β-livetin）、及 IgY（γ-livetin）三種，其含量比例約為 2：5：3(Schade, Rudiger et al., 2007)，而本研究之目的即在於開發分離純化蛋黃 IgY 的方法。

由於蛋黃的組成中，由脂蛋白顆粒等所組成的固形物（solid）占將近 50% (Anton, 2007)，又含量豐富的脂質常會對後續的純化工作造成干擾(Hansen et al., 1998)，是以現有的蛋黃 IgY 萃取方法都以去脂步驟開始(Schade, R. et al., 2005)。目前最常見的去脂步驟包括 PEG 沉澱法(Polson et al., 1980; Polson et al., 1985; Prabhu et al., 2010)和水稀法(Akita et al., 1992, 1993; Ruan et al., 2005)兩種；前人的研究結果顯示，若以粗萃液的 IgY 產率（yield）與純度（purity）為比較標準，

則水稀法較 PEG 沉澱法為優(Akita et al., 1993; Verdoliva et al., 2000; Araujo et al., 2010)。

水稀法將蛋黃加水混合稀釋，主要目的在建立一低離子強度（low ionic strength）的環境，使在該環境下並不穩定的脂溶性物質相互結合、堆聚、沉澱，而達到與水溶性蛋白質（如 IgY）分離的效果(Akita et al., 1992)。水稀法的去脂效果會受到包括稀釋程度、酸鹼值、作用時間、及鹽類添加量等多重因素的影響(Akita et al., 1992; Ko et al., 2007)。目前將水稀法應用於蛋黃 IgY 萃取的限制包括有：（一）作用時間長，需在低溫下反應 5.5 h 以上（通常為 6 h 或 overnight）才能達到穩定的去脂效果；（二）粗萃液仍需藉由後續的多個分離步驟，才能獲得純度適當的 IgY 樣品(Brunda et al., 2006; Zhen et al., 2008; Prabhu et al., 2010)。這些限制不但延長完成純化工作所需要的時間、增加純化工作的複雜度、也會降低一般實驗室及產業界對使用 IgY 的意願。

在思考如何克服上述水稀法之缺點的同時，我們注意到前人的研究資料顯示，水稀法的諸項影響因素中，作用環境的酸鹼值最為關鍵：在 pH 值低於 4.2 或高於 9.0 的作用環境中，蛋黃中的顆粒成分並無法被離心沉澱，但在 pH 值為 5.0~5.2 的條件下，不僅可離心去除超過 98%的脂質，IgY 的回收率也在 92%以上(Akita et al., 1992)；而

Ko and Ahn (2007)的研究結果也發現，萃取試劑的 pH 值從 6 下降為 5 時，粗萃液的 IgY 含量雖無明顯變化，但其脂質含量卻顯著下降 12.5 倍。上述的資料說明，當以水稀法萃取蛋黃 IgY 時，其去脂效應屬於 pH-dependent 的作用，並且僅有狹窄的適用 pH 範圍。然而前人的研究也發現，不同顆雞蛋之間，其蛋黃的 pH 值並不盡相同，水稀液的氫離子濃度甚至可差距達 5 倍或 5 倍以上(Akita et al., 1992; Lei et al., 2012)。考慮去脂效應對 pH 值的敏感性及蛋黃本身 pH 值的變異性之同時，我們推測以具有較佳 pH 緩衝效應的 0.1M 醋酸鈉溶液（pH 5.0）來取代酸水（pH 5.0），可能會有較穩定的蛋黃 IgY 萃取效果。此一改變也有另外的邊際效應，包括可省去實驗期間測量與調整 pH 的步驟，亦可因此減少電極的去蛋白操作次數而延長其使用壽命。

期初的比較實驗顯示，在給予充分作用時間（6 h）的前提下，醋酸鈉溶液對蛋黃 IgY 的萃取效果與酸水的萃取效果相同（表一、圖一），此結果也證實 0.1M 醋酸鈉溶液確可被用作為蛋黃 IgY 的萃取試劑，而該溶液所具有的離子強度應尚不致於對蛋黃的去脂作用造成影響；隨後縮短低溫攪拌時間的實驗結果則顯示，當以醋酸鈉溶液作為萃取試劑時，去脂作用僅需 0.5 小時即可達成充分的效果（表二、圖二），相較於酸水所需要的 5.5 小時以上(Akita and Nakai, 1992)，醋酸鈉溶液明顯具有提升萃取時效的優勢，我們推測此一優勢應該與醋酸鈉溶

液較能穩定維持作用環境的 pH 值有關，而圖五的結果也支持該論點：酸水對照組的 pH 值於攪拌期間迅速下降，應與空氣中的二氧化碳溶入有關，二氧化碳溶入水中則會形成碳酸，碳酸再解離為碳酸根離子與氫離子，而使得溶液的酸鹼值下降，另兩組蛋黃稀釋液樣品的 pH 值上升則說明蛋黃脂質的堆聚過程會消耗稀釋液中的氫離子，使酸鹼值不降反升。由於醋酸鈉溶液具有酸鹼緩衝的功效，能補充被耗去的氫離子，故除了反應初期可能因可堆聚的脂質量最高，致使醋酸鈉稀釋液的 pH 值些許上升（5.0→5.1），隨後該樣品則能恆定維持在 5.1 範圍。另一方面，由於酸水不具酸鹼緩衝的效果，無法補充被耗去的氫離子，因此隨著蛋黃脂質堆聚過程的進展，酸水稀釋液樣品的酸鹼值也逐漸持續上升。

當醋酸鈉溶液的 pH 值偏離 5.0 時（4.6 或 5.4），粗萃液的澄清度也隨之下降（圖三）；當醋酸鈉溶液的 pH 值偏離至 4.2 時，粗萃液已經變得黃濁。前人的報告中曾指出，蛋黃的黃色是由於類胡蘿蔔素（carotenoids）存在之故(Laca et al., 2010)，當這些脂溶性物質無法與特定種類的蛋白質形成脂蛋白顆粒而被沉澱時，蛋黃粗萃液即變得黃濁。因此，無論是選擇純水或醋酸鈉溶液作為蛋黃 IgY 的萃取試劑，其去脂作用均為 pH-dependent 的反應，並且也都僅有狹窄的適用 pH 範圍。根據前述，我們亦可延伸推論，以 pH 為 4.2 的醋酸鈉溶液所

製備的蛋黃粗萃液，其蛋白質濃度應為最高，但 IgY 的純度會最低（因去脂效果差，含有較高量脂蛋白成分之故）；反之，以 pH 為 5 的醋酸鈉溶液所製備得到的蛋黃粗萃液，其蛋白質濃度應為最低，但 IgY 的純度會最高（因去脂效果佳，含有較少量脂蛋白成分之故），而表三與圖四的結果則與該推論吻合一致。

是以，本研究發現 0.1 M 的醋酸鈉溶液（pH 5.0）具有被應用為雞蛋蛋黃 IgY 萃取試劑的良好性質，能穩定提供氫離子，有助脂蛋白在短時間內堆聚，故呈現比目前常用的水稀法更為快速的蛋黃去脂效果。本研究以醋酸鈉溶液製備的蛋黃粗萃液中，IgY 的濃度約為 9.1 mg/10 mL（源自 1 mL 蛋黃液，資料計算自表二~表四的平均值），純度則約為 30.6 ± 6.0%，此一產率（yield）與純度（purity）的數據與前人以水稀法萃取蛋黃 IgY 的結果相似(Akita et al., 1993; Verdoliva et al., 2000)。本論文在後續的研究中（詳見本論文的第四章），曾多次利用以醋酸鈉溶液粗萃取的 IgY 抗體進行免疫轉漬（immunoblotting）與 ELISA 分析實驗，並獲得良好清楚的訊號，顯示醋酸鈉粗萃液中的 IgY 仍能保有正常的生物活性。此外，為能減少蛋黃因被稀釋而膨脹的體積，本研究也曾嘗試添加濃度加倍但體積減半的醋酸鈉溶液，結果去脂的效果並不理想（data not shown），說明 0.1M 的醋酸鈉溶液濃度及 10X 稀釋蛋黃的使用參數，可能為最佳的

組合條件。

為將粗萃液中的 IgY 進一步純化，本研究也進行硫酸銨的鹽析試驗，表四的資料顯示，隨著硫酸銨的飽和度增加，IgY 的回收率亦隨之增加，但純度卻遞次下降，例如在 30%硫酸銨飽和度的條件下，IgY 的回收率將近 50%，但純度可高達 90%，而在 60%硫酸銨飽和度的條件下，IgY 的回收率雖可達 96%，但純度卻下降至 53%。根據上述實驗結果，各實驗室可依據 IgY 樣品的後續用途來抉擇沉澱 IgY 所需的硫酸銨添加量，例如若需在短時效內快速獲得高純度的 IgY 樣品，則可選擇 30%飽和度的硫酸銨添加量；若後續需要藉抗原管柱來進一步純化專一的 IgY 抗體，則可選擇 60%飽和度的硫酸銨先沉澱大部分的 IgY，再進行後續專一性抗體的純化。

為方便化及普及化 IgY 抗體的應用，發展簡單、快速、又經濟的萃取方法有其必要性。現今最常用的 PEG 沉澱法或水稀法，均需進行多重的步驟，並且耗時冗長（表五）；近期 Tan et al. (2012)以含果膠（gum pectin）、卡拉膠（κ-carrageenan）和氯化鈣（$CaCl_2$）的溶液進行蛋黃的去脂作用，再搭配兩次不同飽和度的硫酸銨沉澱步驟，可於 5h 內從 1 顆蛋黃中分離得到 60 mg 純度達 80%的 IgY 樣品，且試劑花費僅需約 5 美元；而本研究所發展的 IgY 萃取方法則是先以醋酸鈉溶液進行蛋黃的去脂作用，再藉硫酸銨鹽析沉澱 IgY 樣品，此一兩

步驟的方法可於 2h 內從 1 顆蛋黃中分離得到近 90 mg 純度超過 80％的 IgY 樣品（表五；Current protocol, 40％ AmS saturation），並且試劑花費估計為 1.5 美元。由於本研究所開發的方法在簡易性、方便性、與經濟性等方面均較現有的各種方法為佳，亦無使用任何有機溶劑，能減少環境的負擔。本方法除了可供一般實驗室例行萃取 IgY 採用，也易被放大規模以達成產業界大量生產之目的。

表五、不同 IgY 萃取方法的比較。

	Polson et al. (1980)	Akita and Nakai (1992)	Tan et al. (2012)	Current protocol	
Extraction buffer	PBS (pH 7.5)	Distilled water (pH 5.0)	0.06% κ-carrageenan 0.18% low-methoxyl pectin 10 μM $CaCl_2$	Acetate buffer (0.1 M, pH 5.0)	
Procedures	2× dilution ↓ 3.5% PEG-6000 ↓ 20 min incubation @ RT ↓ centrifugation ↓ supernatant & filtration ↓ 12% PEG-6000 ↓ 20 min incubation @ RT ↓ centrifugation ↓ pellet resuspension ↓ overnight dialysis	10× dilution ↓ 6 hr stirring @ 4℃ ↓ centrifugation ↓ supernatant ↓ AmS 60% sat. ↓ centrifugation ↓ pellet resuspension * ↓ purification by other chromatographic methods	5× dilution ↓ 2 hr stirring @ 4℃ ↓ centrifugation ↓ supernatant ↓ AmS 30% sat. ↓ pellet resuspension ↓ AmS 20% sat. ↓ centrifugation ↓ pellet resuspension	10× dilution ↓ 0.5 hr stirring @ 4℃ ↓ centrifugation ↓ supernatant ↓ AmS 40% sat. ↓ centrifugation ↓ pellet resuspension	AmS 60% sat. ↓ centrifugation ↓ pellet resuspension
IgY per mL yolk (purity)	2.9-5.7 mg (80%)	11.8 mg * (30%)	~5 mg (~80%)	6.3 mg (83%)	8.9 mg (53.1%)
Time consuming	overnight	7 hr *	5 hr	2 hr	2 hr

* Akita and Nakai (1992)的操作時間及 IgY 樣品產量與純度皆擷取其萃取步驟至硫酸銨鹽析沉澱。

第三章 冷凍蛋黃 IgY 的簡易、有效萃取方法

（A simple and effective protocol for extraction of IgY from frozen egg yolk）

第一節 摘要

由雞蛋蛋黃生產 IgY 的過程簡便、產量豐富、成本低廉且較符合人道要求，因而已漸成為生產多株抗體的新興方式。由於雞隻的產蛋效率高，雞蛋又不耐久存，故在選擇以雞蛋來生產多株抗體時，亦需考量雞蛋的儲存空間、保存期限、被汙染的機會、及抗體純化時機的彈性等因素，因此我們認為將蛋黃分離收集並予冷凍保存，應是一恰當的因應措施。然而高含量的 LDL 使蛋黃在冷凍過程中產生凝膠反應，以致解凍後無法以常用的水稀法或本研究先前開發的醋酸鈉萃取法來萃取其中的 IgY 抗體。故本研究之目的即在開發一簡易、有效萃取冷凍蛋黃 IgY 的方法。

本研究發現以水性溶液稀釋解凍後的蛋黃，經離心獲得的蛋黃粗萃液仍呈黃濁狀，表示此一操作無法有效去脂，因此添加適當比例的氯仿至前述樣品中，藉離心來去除蛋黃粗萃液中殘留過多的脂質；收集低脂質含量的蛋黃粗萃液後，可直接應用於多種免疫化學試驗；在粗萃液中添加硫酸銨至 30%與 50%飽和度，則可分別獲得純度為 91%、59%，而回收率為 48%、89%的 IgY 樣品。在我們能得知的範

圍內，本研究方法是目前首次提出將蛋黃液冷凍保存後，再萃取其內 IgY 抗體的方法，且整體操作過程在 2.5 小時內即可完成，將能有效提升蛋黃 IgY 的應用價值。

第二節 緒言

多株抗體由於具有辨識抗原上多種表位的能力，因此對於抗原具有高度敏感性，已被廣泛應用於醫事檢驗、基礎研究、醫療診斷等用途(Lipman et al., 2005; Newcombe et al., 2007)。目前常見之多株抗體皆以兔、羊等大型哺乳類動物的血清為主要來源(Leenaars et al., 1999)，相較於哺乳類動物，飼養雞隻的所需空間相對較小、成本花費較低、抗體產量豐富，也可免用抽血的方式收集抗體，生產過程更加人道，符合實驗動物福祉要求(Chalghoumi et al., 2009)；又鳥類與哺乳類具有一定的親緣差距，且鳥類 IgY 與哺乳類 IgG 分子在 Fc 部位的序列上有顯著差異，故 IgY 不會與哺乳類的補體（Complement）、類風濕因子（Rheumatoid factor）及 Fc 受體（Fc receptor）等發生作用，可減少對人類血清進行檢驗或其他分析時的背景反應與干擾(Larsson et al., 1991; Larsson et al., 1992)，因此近年來雞隻蛋黃中的 IgY 抗體逐漸受到重視，深具研究及產業發展的潛力，使雞隻富有取代哺乳類動物的優勢(Gasparyan, 2005; Michael et al., 2010)。

一顆蛋黃的 IgY 含量高達 100 mg(Schade, R. et al., 2005)，而一隻雞在正常情況下，每個月將可產超過 25 顆蛋(Pauly et al., 2011)，抗體年產量將是一隻兔的十數~百餘倍以上(Schade, R. et al., 1991; Schade, R. et al., 1996; Schade, R. et al., 2005)，故以雞隻做為抗體生產來源可

有效減少動物使用量。由於雞隻產蛋效率高，通常實驗室飼養的雞隻數量為數十至數百隻，產業界則更是高達數千隻以上，短時間就能累積為數眾多的雞蛋，若無法在產蛋當天進行蛋黃中 IgY 的萃取，則需要建立完善的雞蛋儲存方式。實驗室本身的空間有限，且室溫下的存放時間也無法過久，也會有受細菌汙染的風險，冷藏環境另有空間及時間上的限制，若將蛋黃與蛋白分離後，再進行冷凍保存則能減少儲存空間的需求，並且能維持其中蛋白質穩定及延長保存的時間，同時也可提升產業界在抗體純化時機的彈性，便於隨時因應需求再將含特定抗體的蛋黃解凍以萃取 IgY。將蛋黃冷凍或可有利於妥善保存其中的抗體，然而高含量的脂質卻使蛋黃在冷凍後不利於 IgY 萃取。

蛋黃中含有 34%的脂質(Li-Chan et al., 2007)，且含大量的低密度脂蛋白（low density lipoprotein, LDL），冷凍過程中，LDL 分子間的微小冰晶會相融合成大型冰晶，使 LDL 分子裸露出來，增加分子間碰撞而凝集的機會，使得蛋黃發生凝膠反應(Wakamatu et al., 1983)。凝膠狀蛋黃中充斥著凝集化的脂蛋白，藉水稀法(Akita et al., 1992, 1993) 與本實驗團隊所發展的醋酸鈉萃取法（請參考第二章之內容）在稀釋蛋黃後，皆無法藉離心達到去脂的效果，造成冷凍保存後的蛋黃無法進行 IgY 的萃取與後續應用。將蛋黃冷凍保存對 IgY 生產方面具有許多優點，將能更為妥善的儲存蛋黃，尤其是可長時間保存，因

此本研究認為開發從冷凍蛋黃中萃取 IgY 的簡便方法，讓蛋黃液在經長時間的冷凍保存後，仍能快速並有效的從中萃取 IgY，此舉將減少液態蛋黃對萃取 IgY 的必需性，也能有效降低雞蛋囤積的壓力。

第三節 材料與方法

1. 蛋黃的收集

請參考第二章-第三節-1，蛋黃液另存於一乾淨容器後放入–20℃保存。

2. 冷凍蛋黃的氯仿萃取

將冷凍蛋黃解凍後，以玻棒將塊狀蛋黃打散在 9 倍體積的 PBS〔10 mM（w/v）Sodium phosphate, 140 mM (w/v) NaCl, pH 7.4〕中，再以攪拌子攪拌 30 分鐘（4℃），離心（12,000×g，4℃，30 min）後收集上層液，分裝 10 mL 至不同的離心管中，分別加入 5、10 及 20 mL 氯仿，使氯仿最終的體積濃度為 33%、50%、66%，震盪 30 秒並置於冰上 10 分鐘，接著再次離心（12,000×g, 4℃, 30 分鐘），離心後謹慎吸取上層蛋黃粗萃液至乾淨容器中收集或儲存，隨後進行蛋白質分析，或進一步以硫酸銨鹽析沉澱蛋白質。

3. 蛋黃 IgY 的硫酸銨鹽析沉澱

請參考第二章-第三節-3。

4. SDS 膠體電泳分析（Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE）

請參考第二章-第三節-4。

5. 蛋黃 IgY 的定量分析

請參考第二章-第三節-5。

6. 蛋白質定量

請參考第二章-第三節-6。

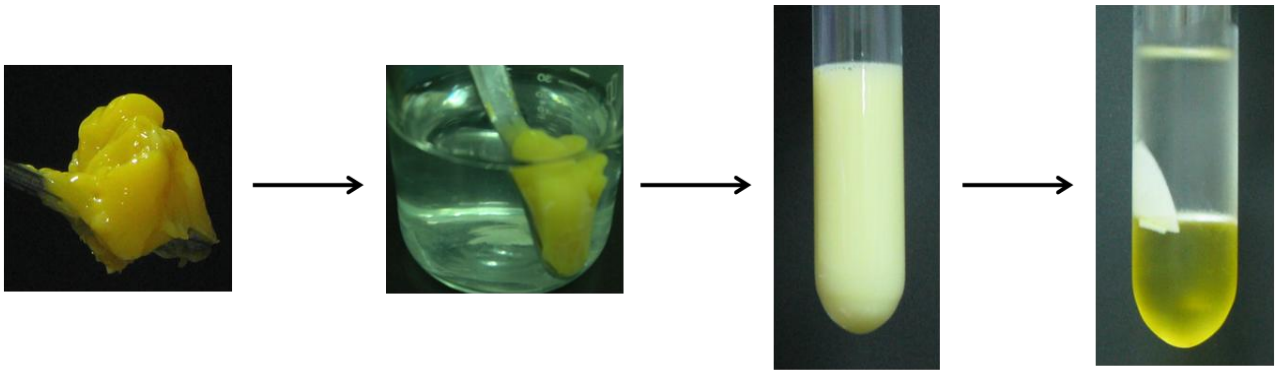
7. 統計分析

請參考第二章-第三節-7。

第四節 結果

1. 冷凍蛋黃萃取 IgY 的過程

蛋黃冷凍過程中，因含量豐富的 LDL 分子聚合，使得蛋黃在解凍後呈現凝膠狀態（圖一 A），不易溶於酸水、醋酸鈉溶液或 PBS 等水性溶液中（圖一 B），經攪拌子進行充分攪拌後，方能使蛋黃與溶液混合均勻，再藉離心可收集到呈黃濁狀的上清液（圖一 C），推測其中的膽固醇、脂蛋白、類胡蘿蔔素等脂質並未完全去除(Smith et al., 1966; Awad et al., 1997)，因此我們參考以氯仿萃取蛋黃 IgY 的文獻(Pour-Amir et al., 2000)，選擇添加與蛋黃粗萃液等體積的氯仿，再藉離心使之和水溶性物質分離，即可見在上方呈清澈貌的水層（圖一 D），此即為冷凍蛋黃的粗萃液，下層液則是溶解脂溶性物質後呈黃色的氯仿層，而在水層與氯仿層中間則有一層淡黃色脂質薄膜存在，由此可見氯仿具有去除冷凍蛋黃粗萃液中的脂質之功效。



A　　B　　C　　D

圖一、冷凍蛋黃的粗萃取過程示意圖。

蛋黃冷凍過程中發生凝膠反應，解凍後的蛋黃則呈膏狀（A），放入 PBS 中不易與之混合均勻（B），經過攪拌與離心的步驟，可收得十分黃濁的上清液（C），添加氯仿（使用濃度為 33%）後再進行離心即可獲得清澈透明的上清液（D），此即為冷凍蛋黃的粗萃液。

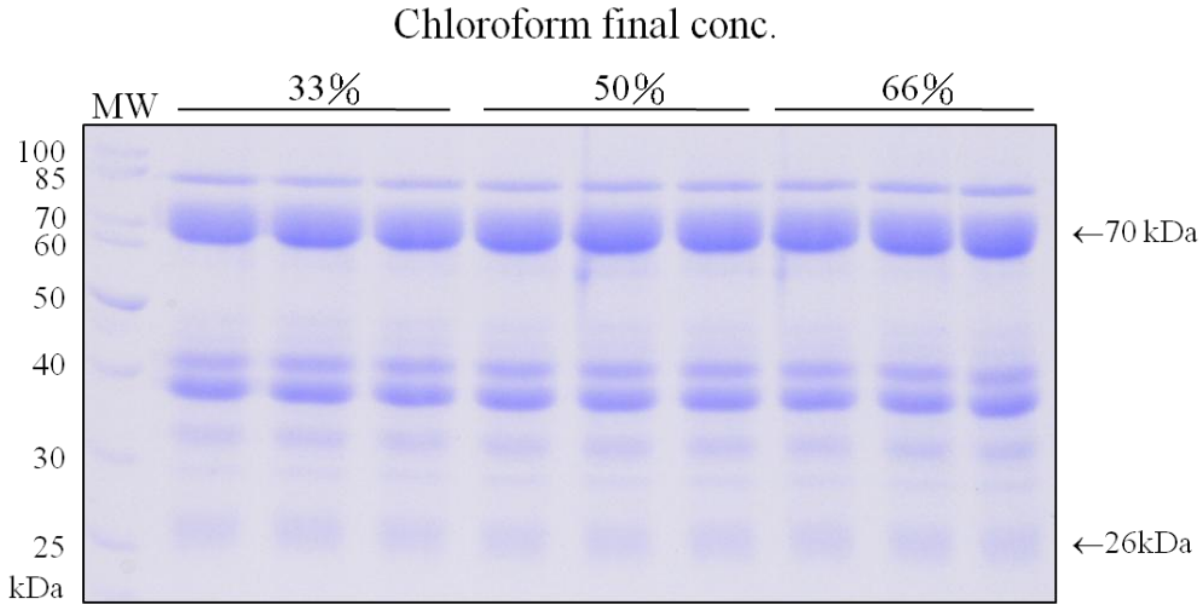
2. 氯仿使用量與蛋黃粗萃液的蛋白質分析

由於氯仿為具有毒性的化合物，使用過程中容易對操作者引起致癌可能，同時處理不當也會對環境產生污染，因此首先須測試不同氯仿用量對去除脂質的影響，以求能在較少氯仿用量的操作下進行 IgY 萃取。Pour-Amir et al. (2000) 將蛋黃稀釋後進行離心，回收蛋黃粗萃液，再添加與粗萃液等體積的氯仿進行去脂，本實驗則選擇將萃取液與氯仿的體積比設定為 1:0.5、1:1、1:2。結果發現三種氯仿使用量皆可透過離心回收到清澈的蛋黃粗萃液，具有相當的去脂效果，蛋白質與 IgY 的定量分析（表一）則顯示三種粗萃液中的 IgY 含量並無顯著差異，每毫升蛋黃能萃得的 IgY 為 9.4～9.8 mg；每毫升蛋黃能萃取獲得的蛋白質含量則在 27.3～29.1 mg 之間，統計上亦無明顯差別。取等量蛋白質進行 SDS-PAGE 及 CBB 染色（圖二），可發現各組萃取液中的蛋白質成分皆相似，含量亦呈現一致，因此將蛋黃稀釋液與氯仿的體積比設定為 1:0.5，即氯仿濃度為 33%，已足夠達到良好的去脂效果，幫助獲得均質化的蛋黃粗萃液，其中的 IgY 蛋白質成分也與利用醋酸鈉萃取法從液態蛋黃製備的粗萃液相當（請參考第二章之內容）。

表一、不同氯仿使用量對蛋黃成分萃取效果的比較。

	Chloroform final conc.		
	33%	50%	60%
IgY (mg) / mL yolk	9.5 ± 0.3^{a}	9.8 ± 1.2^{a}	9.4 ± 0.9^{a}
Protein (mg) / mL yolk	29.1 ± 1.1^{b}	28.1 ± 3.9^{b}	27.3 ± 1.9^{b}

表中數值為三次重複實驗結果的平均值與標準差。同一列數值中上標的英文字母相同時，代表各處理間無顯著差異（$p > 0.05$），若上標的英文字母相異時，則表各處理間具有顯著差異（$p < 0.05$）。



圖二、氯仿處理之蛋黃粗萃取液的電泳分析結果。

將氯仿處理過的三種蛋黃粗萃取液，各取約 8 μg 蛋白質進行 12% SDS-PAGE 與 CBB 染色的結果。圖右側分別標記 IgY 的 H chain（70 kDa）及 L chain（26 kDa）之位置。MW 則為蛋白質分子量標準品（Bioman，PL01425）。

3. 蛋黃粗萃液的硫酸銨鹽析沉澱測試

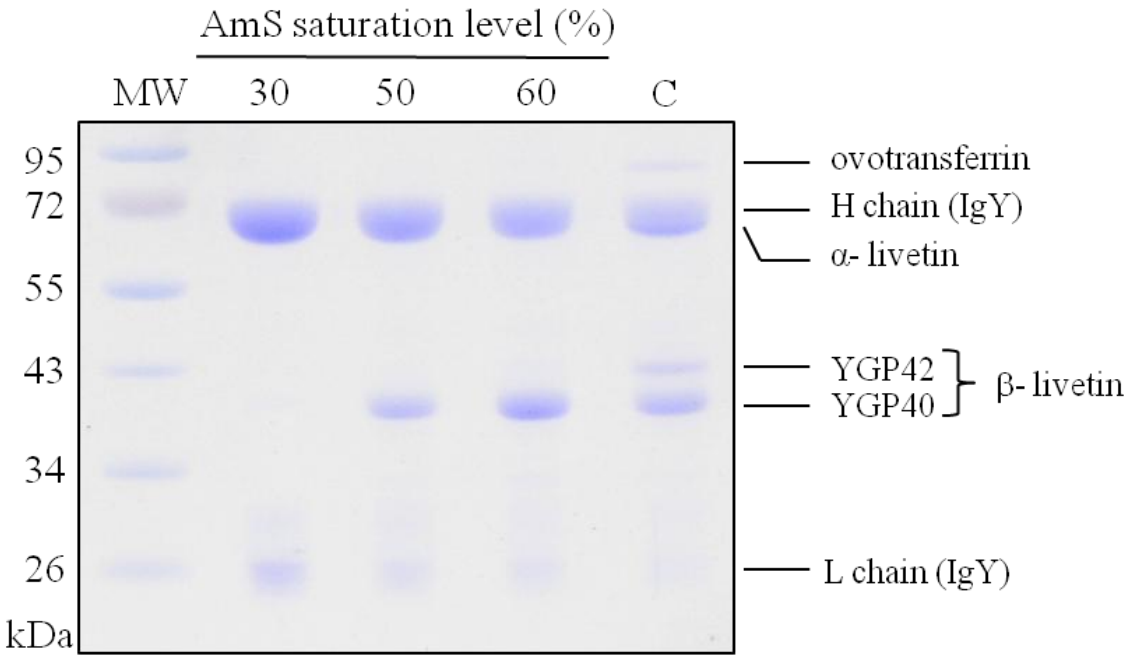
收集冷凍蛋黃的粗萃液後，添加不同飽和度（30%、50%及 60%）的硫酸銨鹽析沉澱蛋白質，再分析其中的 IgY 與蛋白質含量變化情形。表二的結果顯示，添加硫酸銨至粗萃液中的量越多，總蛋白質（total protein）及 IgY 被沉澱的量亦隨之增加，並且兩者間非以等比例的形式變化：當添加 30%飽和度的硫酸銨時，10 mL 蛋黃粗萃液可沉澱出 4.2 mg 的蛋白質，其中 3.8 mg 為 IgY，純度高達 91%，然而回收率僅 48%；在 50%硫酸銨飽和度的條件下，同體積的蛋黃粗萃液則可析出 12.4 mg 的蛋白質，其中含 7.3 mg IgY，回收率則提高到 89%，但純度下降至 59%。

從不同硫酸銨飽和度鹽析沉澱的樣品中，取等量蛋白質進行 SDS-PAGE 及 CBB 染色，結果（圖三）可見隨著硫酸銨飽和度增加，沉澱樣品中的α-、β- livetin 與其他蛋白質的實際含量亦逐漸增加，使得 IgY 的相對含量逐漸遞減。

表二、蛋黃粗萃液的鹽析沉澱結果。

		AmS saturation level		
	per mL yolk	30%	50%	60%
Protein content (mg)	28.9 ± 21^{a}	4.2 ± 0.4^{b}	12.4 ± 0.4^{c}	14.6 ± 0.8^{d}
(Recovery)	(100%)	(15%)	(43%)	(50%)
IgY content (mg)	8.2 ± 0.6^{e}	3.8 ± 0.3^{f}	7.3 ± 0.3^{g}	7.3 ± 0.6^{g}
(Recovery)	(100%)	(48%)	(89%)	(89%)
IgY purity (%)	28.4 ± 1.1^{h}	90.9 ± 6.1^{i}	59.1 ± 3.4^{j}	50.3 ± 3.7^{k}

表中數值為三次實驗結果的平均值與標準差。統計處理時首先進行 ANOVA 分析，若組間具有差異，則再進行 t-test 交叉分析組間的差異情形。同一列內的上標英文字母相同時，代表各處理間無顯著差異（$p > 0.05$）；相異時則表各處理間具有顯著差異（$p < 0.05$）。



圖三、不同鹽析產物的電泳分析結果。

將冷凍蛋黃的粗萃液（C）及經不同硫酸銨飽和度（30%～60%）沉澱的樣品，各取 3 μg 蛋白質進行 12%SDS-PAGE 與 CBB 染色。圖右標示出蛋黃中特定蛋白質的分佈位置。MW 為蛋白質分子量標準品（Bioman，PREP1025）。

第五節 討論

雞蛋蛋黃中的脂質佔 34%(Li-Chan et al., 2007)，且大部分脂質會與特定的蛋白質結合，形成非水溶性的脂蛋白顆粒，散佈在親水性的漿液成分當中，對 IgY 的純化工作與後續應用常造成嚴重干擾(Hansen et al. 1998)，也會讓蛋黃在冷凍後產生凝膠反應：高含量的 LDL 分子在冷凍過程中失去未凍結的水分子，當未凍結的水減少至維持 LDL 安定的臨界量（0.11-0.16 g/*g* LDL）後，使 LDL 裸露而能互相凝聚所造成的現象(Wakamatu et al., 1983)。前人的研究顯示，-6℃可能為蛋黃膠體現象產生的臨界溫度，低於-6℃將促進蛋黃的黏度上升，而當溫度下降至-18℃以下，蛋黃在 24 小時內即會發生 LDL 凝集的不可逆現象，使液態蛋黃改變為凝膠狀態(Chen et al., 2004)。

蛋黃發生的凝膠反應會使得蛋黃呈現膏狀，解凍後無論放入酸水、醋酸鈉溶液或 PBS 中，經低溫中攪拌 0.5 小時，離心處理皆僅有少部分的脂質沉澱，而上層液則呈現如圖一 C 的混濁狀態，初步判斷是脂質殘留過多之故。酸性溶液在此失去了藉其微酸性環境達成去脂效果的目的，或許是因為 LDL 分子間凝聚的力量較強，氫離子喪失原本設定的功能，因此在後續實驗中改用實驗室常用於溶解蛋白質的之 PBS 稀釋蛋黃。

萃取液態蛋黃中的 IgY 時，氯仿也常用於去除脂質(Ntakarutimana

et al., 1992; Pour-Amir et al., 2000)，因此我們嘗試利用氯仿去除冷凍蛋黃粗萃液中的脂質成分，遂於由 PBS 製成的蛋黃萃取液中添加氯仿，離心後可見脂質溶解在氯仿內而呈黃色貌（圖一 D），上方的蛋黃粗萃液則顯得清澈，因此判斷原本使蛋黃粗萃液呈現黃濁的脂質成份已大致去除，粗萃液樣品將可用於後續分析與純化。

前人在萃取蛋黃 IgY 方面，在蛋黃粗萃液中添加等體積的氯仿已知可獲得良好的去脂效果(Pour-Amir et al., 2000)，而在本實驗中，尚不知氯仿對冷凍蛋黃粗萃液的去脂效果，於是我們將蛋黃粗萃液與氯仿以不同體積比混合，發現本實驗所採用的氯仿使用量皆可有良好的去脂效果，從表一及圖二的結果顯示，其內的 IgY 與蛋白質含量及成分皆不受氯仿多寡的影響，在考量材料的成本與氯仿本身的毒性後，我們認為蛋黃粗萃液與氯仿體積比為 1:0.5（氯仿最終濃度為 33%）是最適當的條件，未來若再減少蛋黃的稀釋倍數，或許可再減少氯仿的使用量。

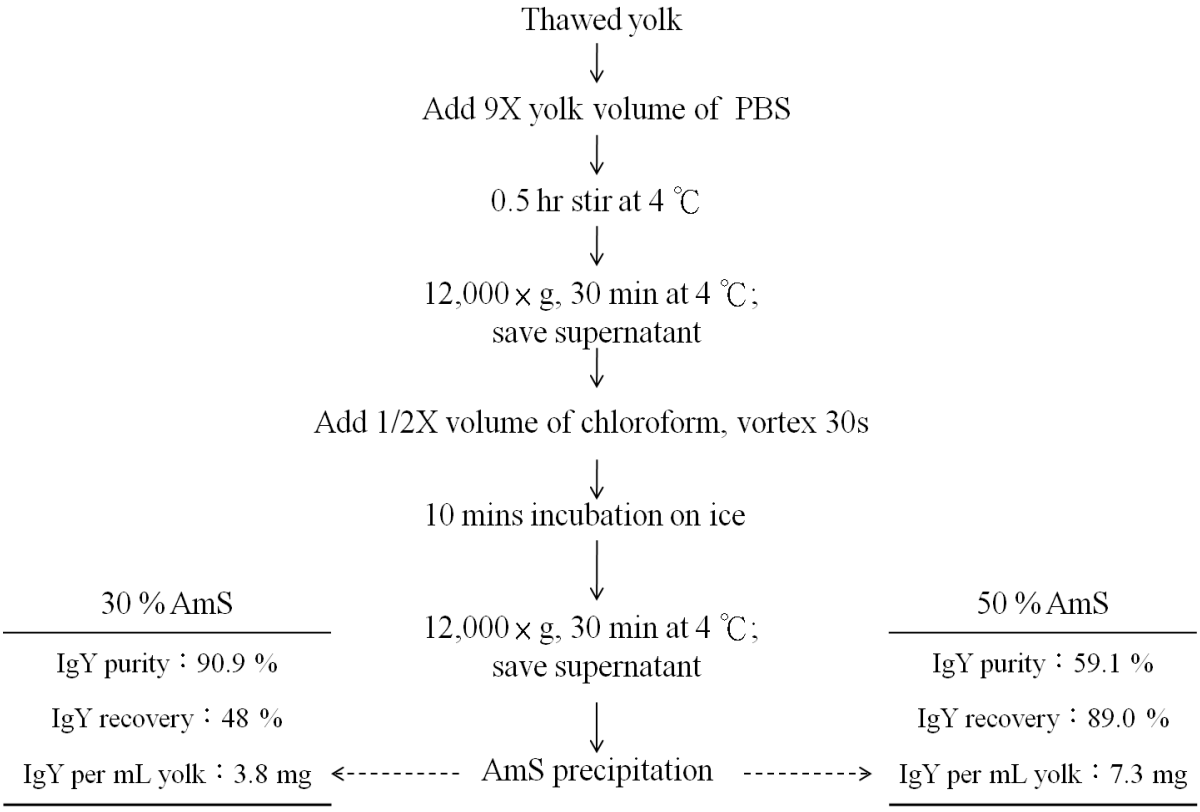
進一步定量蛋黃粗萃液中的蛋白質，發現一顆冷凍過的蛋黃經氯仿處理後可萃得 IgY 約含有 115 mg，純度約為 28.4%（表二），與醋酸鈉萃取法的結果相似（請參考第二章之內容），因此可知以氯仿去除脂質並不會影響萃取液中水溶性蛋白質的成分，其中對抗原具有專一性的 IgY 也仍能保有活性，可應用在免疫化學試驗中辨識抗原（見

本論文第四章)。

蛋黃粗萃液中含有為數眾多的蛋白質種類，除了佔三成左右的 IgY 外，還有 ovotransferrin（80 kDa）、α- livetin（65 kDa）、β- livetin（YGP40，35 kDa、YGP42，40 kDa）及 truncated serum albumin（Δ serum albumin，45 kDa）等等(Yamamura et al., 1995; Nilsson et al., 2006)，隨著硫酸銨添加量增加，IgY 的回收量也跟著增加，但其他非目標蛋白質的沉澱量也隨之增多（圖三），而使 IgY 的純度降低。如表二所示，添加硫酸銨至 30%飽和度，可獲得純度高達 90%的 IgY 樣品，適合應用於需要在短時間內獲得高純度 IgY 樣品的生產過程；當後續需要藉抗原吸附管柱進行純化，則可添加飽和度達 50%的硫酸銨，回收大部分的 IgY 後，再進行專一性抗體的純化。

相較於對中、大型哺乳動物進行採血來生產多株抗體，以雞蛋為抗體的來源具有諸多優點，然而，因為雞隻的產蛋效率高，雞蛋又不耐久存，故在選擇以雞蛋來生產多株抗體時，亦需考量雞蛋的儲存空間、保存期限、被汙染的機會、及抗體純化時機的彈性等因素。一隻雞在正常情況下，每個月將可產超過 25 顆蛋(Pauly et al., 2011)，而實驗室常飼養數十至數百隻，產業界更是達數千隻以上，因此容易在短時間內累積為數眾多的雞蛋，然而室溫環境並不適合雞蛋的長時間儲存，且容易受碰撞而損壞，又低溫環境（4℃、-20℃或更低溫）中的

空間有限，因此應盡可能減少存放雞蛋樣品所需的體積。一顆雞蛋的組成中，蛋白佔 63%，而蛋黃佔 27.5%(Kovacs-Nolan et al., 2005)，我們認為將蛋黃與蛋白分離後，另以容器儲存，將能有效減少對儲存空間的需求，同時也可以減少雞蛋互相碰撞而損壞的風險，再者也可減少暴露在開放環境中，雞蛋受到細菌，如沙門氏菌感染的機會；目前 IgY 抗體的萃取樣品在－20℃或更低溫的環境中保存，將能維持抗體活性達 7 個月以上(da Silva et al., 2010)，因此將含有 IgY 抗體的蛋黃儲存於低溫環境中也可有效保持其蛋白質活性；利用冷凍保存含有有效抗體的蛋黃液，能讓 IgY 抗體生產單位隨時因應需求而將含目標抗體的蛋黃解凍，減少純化多餘蛋黃的人力及成本支出與降低雞蛋囤積之壓力；蛋黃解凍後搭配本研究發展的冷凍蛋黃萃取方法也僅需 2.5 小時即可完成去脂及硫酸銨的沉澱步驟，將能促進實驗室對蛋黃 IgY 的利用與提升產業界對純化抗體時機的彈性。



圖四、冷凍蛋黃的 IgY 萃取流程圖。

第四章 由雞隻蛋黃生產小鼠免疫球蛋白之多株抗體（Polyclonal antibody production in chickens immunized with mouse IgM）

第一節 摘要

本研究取小鼠的 IgM 對雞隻進行免疫注射，再收集雞蛋生產對應的多株抗體。經測試不同的抗原注射劑量，發現 300 μg 的抗原劑量最為恰當，蛋黃中專一性抗體的效價明顯高於其他注射組。本實驗的免疫注射流程造成有效雞蛋的收集時間約為 38 天，並可透過激活注射再加倍延長收集時間。本研究所生產的 IgY 可應用於 ELISA 及免疫轉漬實驗；在抗體的專一性部分，除了可辨識小鼠的 IgM 及 IgG 各亞型的重鏈之外，亦可與小鼠的κ輕鏈作用，但幾乎不會與兔的 IgG 反應，更不會對小鼠的 IgA 重鏈、λ輕鏈及山羊的 IgG 發生交叉反應。

第二節 緒言

1975 年，Kohler 與 Milstein 利用小鼠的 B 細胞（B cell）與瘤細胞融合（myloma cell），保留兩者的優點，製作出可不斷增生並持續分泌抗體的融合瘤細胞（hybridoma cell）(Kohler et al., 1975)，經篩選並保留單一種細胞株，其分泌的抗體即為單株抗體：單一類型免疫球蛋白，僅能辨識抗原上的單一種表位（epitope），高度專一性及均質化的特質也較能提升結果的一致性，已被廣泛應用於免疫實驗偵測、醫學診斷、疾病預防及治療等等(Lipman et al., 2005; Velusamy et al., 2010)，近年也已使用單株抗體檢測癌細胞，並發展出抗體標靶療法治療癌症(Chiarella, 2011; Yang et al., 2011)。

單株抗體的應用廣泛，通常在使用上都需要搭配多株抗體以呈現或放大單株抗體的辨識結果。多株抗體主要由中、大體型哺乳類動物的血清為生產來源(Leenaars et al., 1999)，然而並不利於用來生產對應哺乳動物保守性蛋白質(conserved protein)的抗體，針對此項缺點，可利用與哺乳類親緣差距（phylogenetic distance）較大的雞隻生產相對應的抗體(Gassmann et al., 1990; Gerl et al., 1996; Gasparyan, 2005; Xu et al., 2011)，以減少偽陽性結果的發生。目前已有文獻指出雞隻 IgY 對抗原的敏感度較哺乳類抗體為佳(Danielpour et al., 1995; Doth et al., 1996)，更適用於免疫組織染色分析(Al-Haddad et al., 1999; Di Lonardo

et al., 2001)，同時受背景值的干擾較少(Kunz et al., 1991; Ohnishi et al., 2000; Cipolla et al., 2001)，因此在呈現小鼠單株抗體之辨識結果方面的應用，IgY 抗體是較哺乳類 IgG 抗體更為合適的工具。

免疫注射雞隻所採用的抗原、佐劑、注射方式以及個體本身的條件皆會影響免疫反應的結果(Schade, R. et al., 2005)，適當的免疫注射策略方能較為有效地促使動物生產抗體，當母雞接受特定抗原後，激起與抗原對應的 IgY 大量表現，經由血液循環輸送到卵巢內正在發育的卵母細胞(Rose et al., 1981)，再與膜上的受器結合並送入蛋黃內儲存(Tressler et al., 1987)，因此將可直接以收集雞蛋的方式收集抗體，較一般哺乳動物的採血方式更為簡便、穩定，同時也更符合提升實驗動物福祉的要求(Chalghoumi et al., 2009)。正常情況下，一隻雞每月可產超過 25 顆蛋(Pauly et al., 2011)，每顆蛋黃的 IgY 產量可超過 100 mg (Schade, R. et al., 2005)，其中對應特定抗原的專一性 IgY 約佔 0.5～10％(Schade, R. et al., 1994; Hansen et al., 1998; Li et al., 1998; Schade, R. et al., 2005; Paul et al., 2007; Qu et al., 2011)。由於 IgY 在蛋黃中的含量豐富，因此一隻雞的抗體年產量可高達一隻兔的十數~百餘倍(Hatta et al., 1993)，同時還有飼養方便、成本花費較低等優點，更加提昇應用雞蛋蛋黃 IgY 的潛力。

為實際由雞蛋蛋黃生產具抗原對應能力的 IgY，本研究以小鼠單

株抗體（IgM,κ）為抗原注射雞隻，透過注射不同劑量的抗原，檢測雞隻免疫反應情形，探討適當的免疫注射條件與有效蛋黃的收集時間；從蛋黃萃取含專一性抗體的 IgY 樣品後，再藉由免疫實驗檢測 IgY 對不同抗原的辨識情形。未來收集對抗原具專一性的 IgY 後將可做為搭配小鼠單株抗體使用的二級抗體，或製備成吸附管柱，做為純化小鼠單株抗體的另一選擇。

第三節 材料與方法

1. 雞隻免疫注射

本實驗將 Balb/c 小鼠的單株抗體 8H4（IgM,κ）做為抗原，將 12 隻 52 周齡白色母萊亨雞（*Gallus gallus domesticus*）分為四組（一組三隻）進行免疫注射：依抗原劑量分為 0、30、100、300 μg（文中以 Negative、D30、D100、D300 表示），以滅菌的二次水調整至 500 μL，再添加 500 μL FCA（Freund's complete adjuvant；Sigma，F5881）進行充分乳化，一隻雞共注射乳化後的抗原 1 mL，於胸肌的五個不同位置進行皮下注射；第 30 天時進行與前述相同的第二劑免疫注射，唯抗原以等體積的 FIA（Freund's incomplete adjuvant；Sigma，F5506）進行乳化；第 44 及 82 天再分別施打一次激活注射：抗原劑量減半且不含佐劑，每隻雞共注射抗原 500 μL，同樣於胸肌的五個不同的位置進行皮下注射。

2. 雞隻靜脈抽血

將雞隻的一側翅膀張開並加以固定後，選定尺骨與橈骨之間的上大靜脈，由心臟往翅膀末端方向平行插入 25 G 針頭，血液便緩慢地從針頭另一端流出，隨即拿微量吸管（100～1000 μL）將血液吸取至微量離心管中儲存，約抽取 300 μL，存放於 4℃冰箱中過夜，隔日先

以低速離心（1000×g, 5 分鐘, 室溫）將血清與血球凝塊分開，取出血清至另一微量離心管後，再進行澄清（16,000×g, 10 分鐘, 4℃），澄清後的血清存至另一乾淨微量離心管後加入 0.02%的 NaN_3，即可分裝並分別存放於 4℃及–20℃中備用。第一次注射前開始抽血，之後每隔 15 天抽血一次；激活注射後的第三天抽血，之後每週抽血一次。

3. 蛋黃的收集

請參考第二章-第三節-1，蛋黃液另存於一乾淨容器後放入–20℃保存。

4. 蛋黃 IgY 的氯仿萃取

請參考第二章-第三節-2。添加氯仿至蛋黃粗萃液的最終濃度為 33%。

5. 血清與蛋黃中的專一性 IgY 效價檢測

以酵素連結免疫吸附法（enzyme-linked immuno-sorbent assay; ELISA）定期監測血清中專一性 IgY 的效價表現。將小鼠單株抗體 8H4 以 0.2 M borate saline（配方見附錄四-1）進行稀釋至 0.1 μg/mL，接著加入 50 μL 至 96 孔的 ELISA 盤（Costar EW-01959-20）中各孔，放置室溫 6 小時或 4℃中過夜，抗原吸附完成後以 Wash buffer（配方

見附錄四-1）沖洗三次，再加入 180 μL Blocking buffer（配方見附錄四-1）至各孔洞中，於室溫反應 2 小時或 4℃中過夜；之後，以 wash buffer（配方見附錄四-1）沖洗 ELISA plate 三次，接著加入以 ELISA Diluent（配方見附錄四-1）稀釋 100 倍的血清，每格孔洞 50 μL，放置室溫反應 2 小時後，將 ELISA plate 沖洗三次，再於每格孔洞加入 50 μl Rabbit anti-chicken IgY-alkaline phosphatase（RAC-AP；Jackson，303-055-003；使用 10,000 倍稀釋液），隨後在室溫中反應 2 小時及經過三次沖洗後，在各孔洞加入 50 μL 的 1.6 μM pNPP（配方見附錄四-1）進行呈色，待呈色完成即以分光光度計（BIO-TEK MQX220）偵測吸光值（$OD_{405-490}$），由吸光值製作曲線圖呈現抗體效價的變化趨勢。

檢測蛋黃中專一性 IgY 的表現情形時，將保存於 4℃的蛋黃粗萃液以 ELISA Diluent 稀釋 10 倍，取代上述步驟的血清加至 96 孔盤中，其他步驟如同上述。結果呈現的數據皆為三次重複，並附上標準差（Standard deviation; SD）。

6. SDS 膠體電泳分析（Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）

請參考第二章-第三節-6。

7. 免疫轉漬實驗（Immunoblotting；Western blotting）

將各蛋白質樣品以 SDS-PAGE 分離後，由下往上的順序將塑膠夾板、海綿、濾紙（Whatman ＃1）、硝化纖維膜（PALL，66485）、電泳膠片、濾紙、海綿及塑膠夾板進行組疊，再置入含有 Electroblotting buffer（配方見附錄四-2）的轉漬電泳槽（Hofer TE 22）內，以 40 V 的電壓進行 30 分鐘轉漬。將轉漬完成的硝化纖維膜浸泡在 Blocking buffer 中 2 小時（室溫），隨後以 Wash buffer 進行兩次搖洗，各為 10 分鐘。將硝化纖維膜置入塑膠盒中，加入適量以 ELISA Diluent 稀釋 10 倍的蛋黃粗萃液（取自 D300 組的一顆蛋黃，解凍後以第三章提及的氯仿萃取法製成），於室溫下反應 1 小時，再以 Wash buffer 進行如前述之搖洗過程，隨後依序加入適量 RAC-AP（使用 5,000 倍稀釋液）反應、搖洗等步驟。

最後將硝化纖維膜浸泡在 Western substrate buffer（配方見附錄四-2）內 15 分鐘，取出後放置於水平的石蠟膜上，加入 AP 受質（配方見附錄四-2）並進行避光呈色反應。當呈色清楚時即可將硝化纖維膜移至清水中沖洗，隨後夾在擦手紙內，並以玻璃板壓平風乾，最終保存於護貝膜中。

第四節 結果

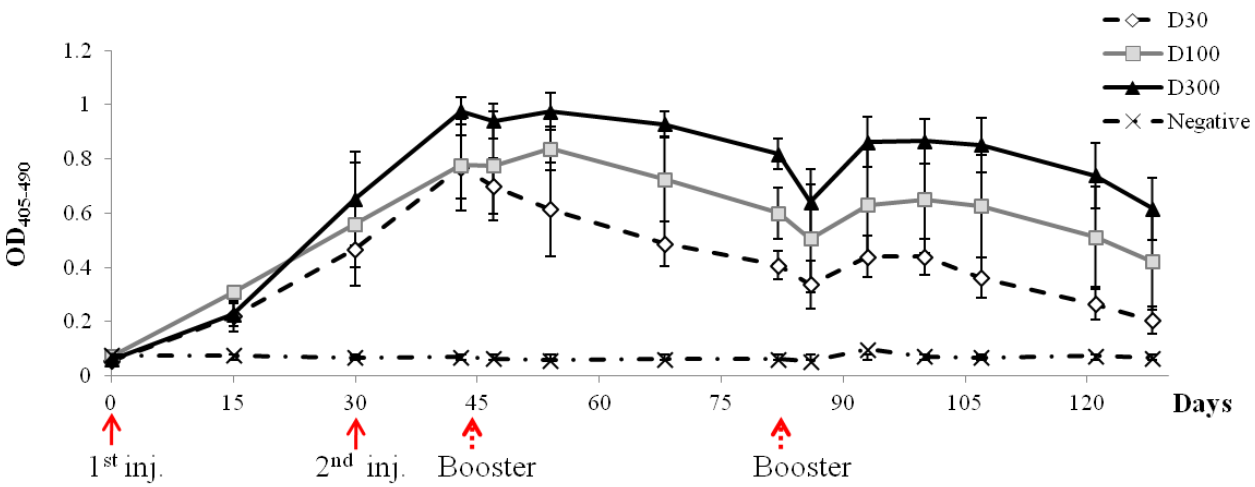
1. 專一性 IgY 在雞隻血清與蛋黃中的表現情形

本實驗依抗原劑量將雞隻分為四組：Negative（0 μg）、D30（30 μg）、D100（100 μg）、D300（300 μg），以 ELISA 方法檢測不同劑量的抗原對專一性抗體表現的影響。血清中的 IgY 效價趨勢圖（圖一）顯示第一針注射後，除了負對照組外，其餘三組抗體效價皆有隨時間上升的變化。圖一 A 可見 D30 組的抗體效價在激活注射前（第 43 天）已升至最高，並在維持 4 天（43～47 天）後即呈下降趨勢；D100 及 D300 組的抗體效價分別在第 54 及 43 天時即達到高峰，並且兩組的高效價時期皆維持 38 天（44～82 天）左右。第 82 天時，三組的抗體效價分別已降為其最高值的 53.8%（D30）、71.5%（D100）及 82.2%（D300）；在第 83 天時進行第二次激活注射，從圖一的結果可見 D100、D300 二組在激活注射後的抗體效價皆優於 D30 組，並且具有相似的效價趨勢，也有將近 40 天的高效價時期。

另外以 ELISA 方式分析蛋黃中的抗體效價，第一針注射後（圖二），除了負對照組外，三個注射組皆有相似的上升變化，且 D30 及 D100 二組的專一性抗體效價在第 48 天時皆達到最高，D300 組則是在第 54 天；D30 組的高效價時期只維持了約 4 天（44～48）即呈現減弱的趨勢，到第 82 天時僅剩最高效價的 46.9%；D100 及 D300 組

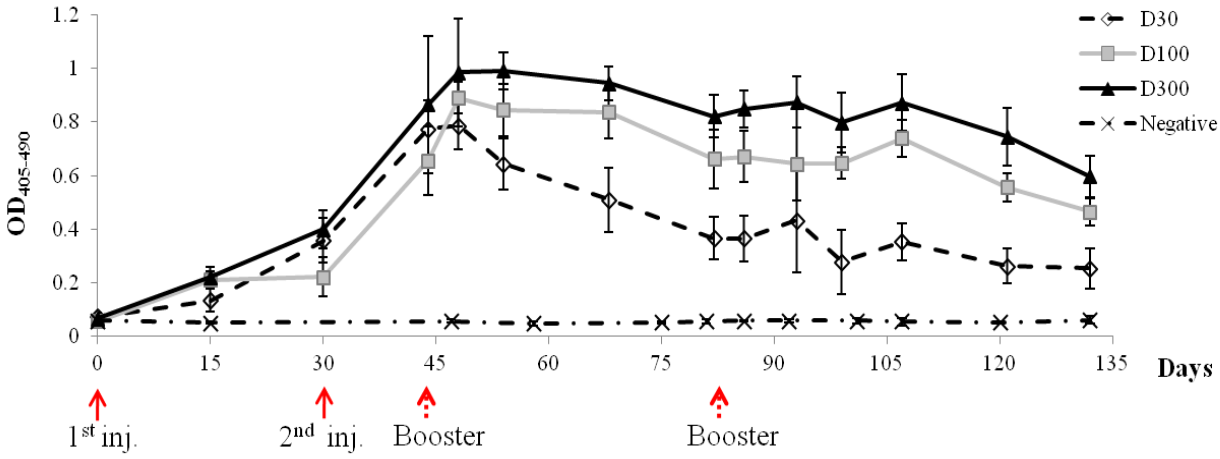
的高效價時期皆維持了約 38 天（44～82），第 82 天時尚有其最高值的 72.7%與 81.4%，與血清中抗體效價減弱的情形相仿。第二次激活注射後的效價趨勢（圖二）顯示三組皆維持著穩定的效價強度，並且呈現D300＞D100＞D30的情形，其中D100組及D300組的效價仍高，維持著穩定的強度近 40 天（第 82～122 天），而由此效價趨勢圖可判斷有效雞蛋的收集時間約為 38～40 天（第 44～82 天、第 82～122 天）。

將血清與蛋黃中同處理組及同時間點的抗體效價數值合併，可發現專一性 IgY 在血清與蛋黃中呈現相似的趨勢（圖三），而血清的抗體效價變化大約領先蛋黃 5 至 7 天的時間。



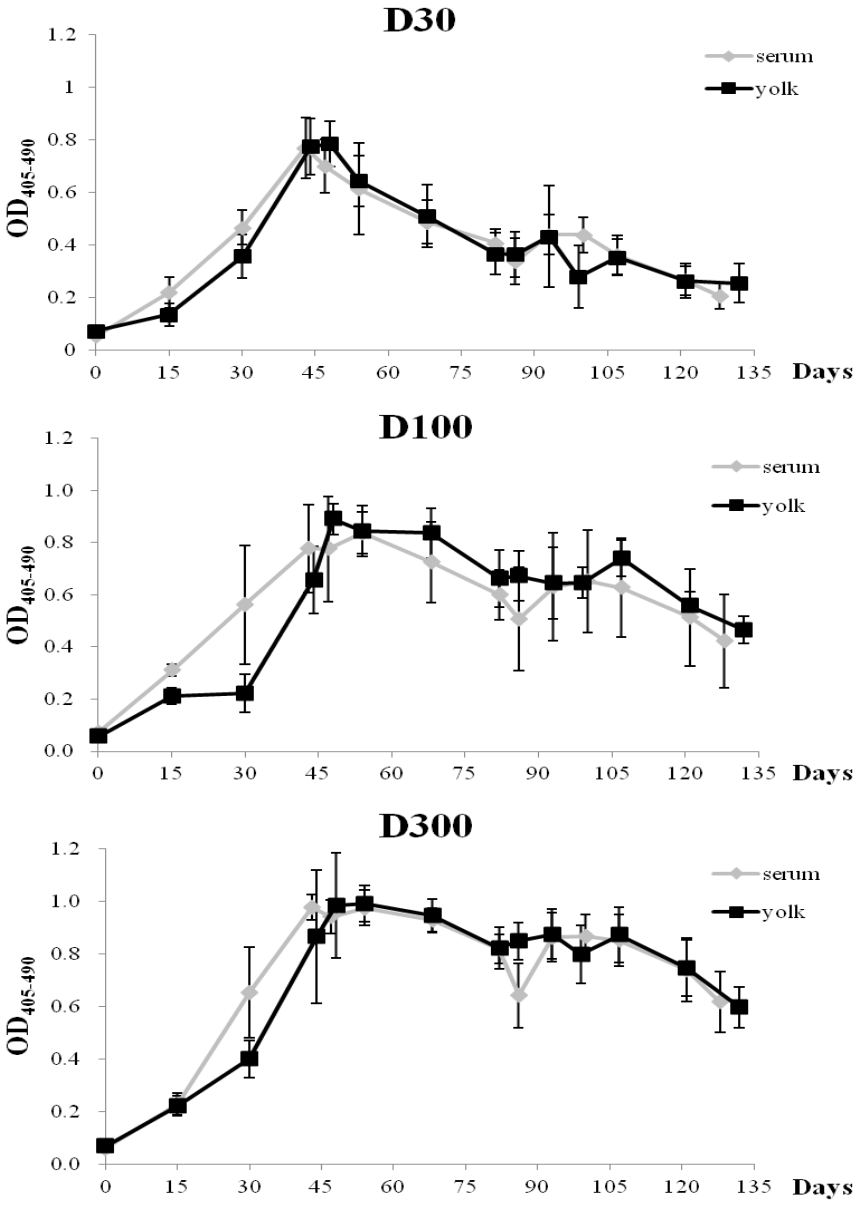
圖一、雞隻血清中專一性 IgY 的效價表現情形。

將收集的血清以 ELISA 的方式檢視血清中專一性 IgY 表現情形。圖中數值皆由同處理組的三隻雞血清所得平均值與標準差。



圖二、雞蛋蛋黃中專一性 IgY 的效價表現情形。

將收集的蛋黃以 ELISA 的方式檢視蛋黃中專一性 IgY 表現情形。圖中數值皆由同個處理組的三顆蛋黃所得平均值及標準差。

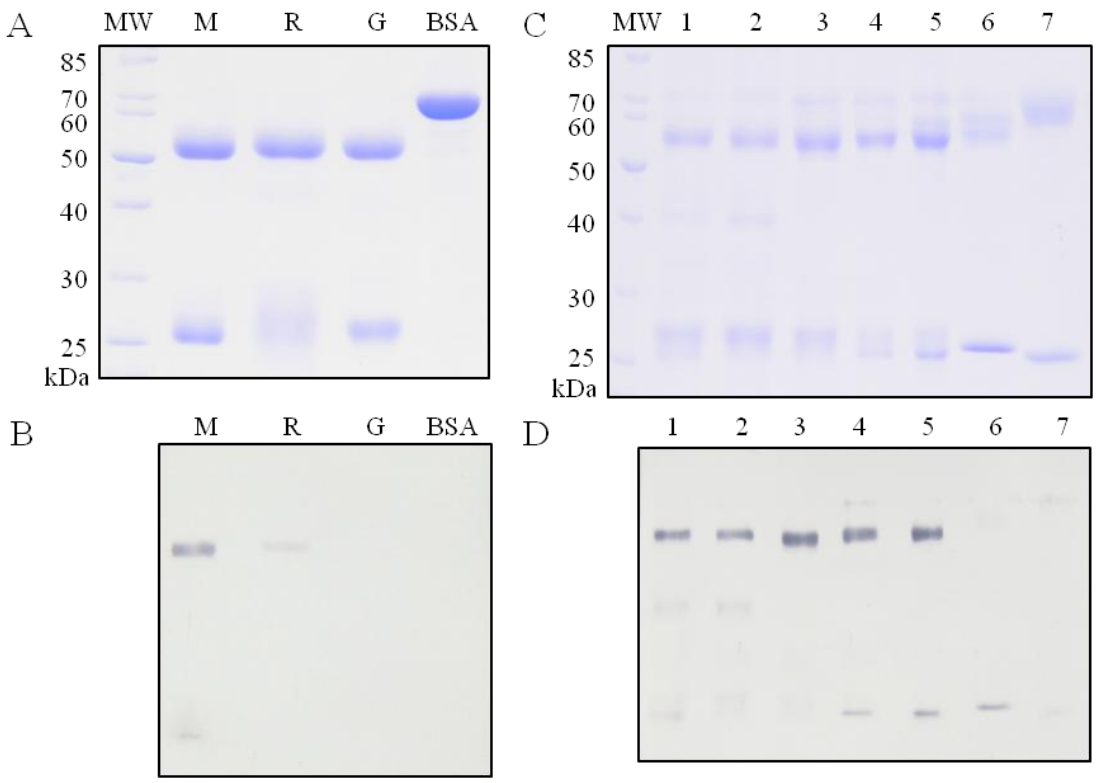


圖三、蛋黃與血清中專一性 IgY 的趨勢比較。

將血清與蛋黃中抗體效價的 OD 值按照雞隻組別以及時間點進行重疊做圖，可見兩者的專一性 IgY 具有相似的效價趨勢。

2. 蛋黃中 IgY 的專一性測試

我們挑選一顆 D300 組的冷凍蛋黃，解凍後以氯仿製成蛋黃粗萃液（請參考第三章之內容），隨後用於免疫轉漬實驗驗證 IgY 對辨識抗原的有效性。首先以 SDS-PAGE 及 CBB 染色分析各待測蛋白質的分布及定量情形（圖四 A、C），確認蛋白質正常且定量一致後，再進行免疫轉漬實驗；圖四 B 可見此蛋黃中含有對應抗原的專一性 IgY 可與小鼠的免疫球蛋白結合，而對兔的重鏈部分也有些許微弱的反應，對羊的 IgG 及 BSA 則是無反應的情形。進一步檢測蛋黃粗萃液中的 IgY 針對各型小鼠免疫球蛋白的結合能力，圖四 D 可見 IgY 不僅可與原本做為抗原的小鼠 IgM 重鏈、κ輕鏈結合，還可結合各類 IgG 亞型的重鏈，然而相較之下，對 IgA 與λ輕鏈的結合力則十分微弱。



圖四、蛋黃中 IgY 針對不同免疫球蛋白的免疫轉漬分析。

取 3μg 蛋白質進行 12% SDS-PAGE 與 CBB 染色分析（A、C），確認各蛋白質的分布並查看蛋白定量情形，另各取 0.2 μg 進行西方免疫染色分析（B、D）。「M」為小鼠 IgG（Sigma，I5381）、「R」為兔 IgG（Sigma，I5006）、「G」為羊 IgG（Sigma，I5256），編號 1～7 分別是小鼠單株抗體 8H4（IgM, κ）、8G6（IgM, κ）、1D3（IgG1,λ）、10E4（IgG2a, κ）、5A1（IgG2b, κ）及 IgA, κ（ICL，RS-90A-K）、IgA,λ（ICL，RS-90A-L），MW 則為蛋白質分子量標準品（Bioman，PL01425）。

第五節 討論

以小鼠為來源的單株抗體常被應用於基礎科學研究及醫學檢驗的用途，改用 IgY 為二級抗體，可因鳥類及哺乳類之親緣差距而減少偽陽性結果的出現機會，此外雞蛋蛋黃 IgY 產量豐富、成本低、生產過程較為人道，因此可取代兔、羊等哺乳類動物，成為較理想的多株抗體來源。

雞隻免疫注射時，抗原種類、分子量大小、劑量與佐劑的使用、注射的時程等，皆會造成免疫反應難以預測(Schade, R. et al., 1996)。抗原劑量過多或過少，可能會讓動物產生抑制、耐受或其他不可預期的效應，導致無法達到有效的免疫反應(Hanly et al., 1995)。Behn et al. (1996) 指出生產雞蛋蛋黃 IgY 時，注射 0.1 mg 的老鼠免疫球蛋白（IgG）會比注射 1.0 mg 的效果為佳，本實驗於是選擇使用小鼠 IgM 為抗原，除了注射 100 μg 抗原外，另取 30 及 300 μg 抗原進行免疫注射，以分析有效的抗原劑量。

在本研究的雞隻免疫注射過程中，隨時間收集血清與蛋黃，以 ELISA 的方式監控專一性 IgY 在二者的表現情形，從抗體效價趨勢圖（圖一、二）可見三組皆有成功激起個體免疫反應。從第一次注射（含 FCA）之後，即開始有效價緩慢上升的一級免疫反應出現，在第二次注射（含 FIA）後則有較為強烈的二級免疫反應，效價提升更為快速，

雖然 D30 組的相對高效價時期較短，但 D100 及 D300 的高效價則能維持近六週；而從結果中無法有效判斷第一次激活注射是否對雞隻的免疫反應產生助益，但第二次激活注射可看出對抗體效價具穩定強度的效果。

佐劑能夠幫助抗原在被注射的動物體內引起發炎反應，並且在體內延長免疫系統的激活效果(Munoz et al., 1984)。佛氏完全佐劑（Freund's complete adjuvant, FCA）和佛氏不完全佐劑（Freund's incomplete adjuvant, FIA）是目前常用於注射實驗動物的佐劑(Freund, 1951)，成份皆為石蠟油（paraffin oil），FCA 則另含有已失去活性的結核桿菌（*Mycobacterium tuberculosis*）屍體，輔助引起發炎反應。Chalghoumi et al. (2008) 的實驗證實注射佐劑可以有效幫助提升雞蛋中的 IgY 抗體效價，雖然 FCA 引發免疫反應的效果較 FIA 強，但會使動物產生小量且短暫的副作用，而 FIA 對動物的傷害程度較小，因此目前常採用兩種佐劑混合使用的方法：將 FCA 用於第一次注射，其他階段的注射則佐以 FIA(Svendsen Bollen et al., 1996; Bizhanov et al., 2004; Brunda et al., 2006; Chalghoumi et al., 2008; Araujo et al., 2010; Palaniyappan et al., 2012)。

目前已有相當多的研究利用雞隻蛋黃生產針對特定抗原的 IgY，依抗原與免疫注射過程的差異而發展出許多不同的方法可供參考（表

一）。Svendsen Bollen et al. (1996) 觀察雞隻在血清與蛋黃中的效價變化長達一年，實驗結果證實有 FCA 參與的免疫注射對激起雞隻的免疫反應較 FIA 與 Hunter's TiterMax adjuvant（HTM）為佳，實驗進行的過程中注射不含佐劑的抗原有幫助維持抗體效價穩定的效果，注射含佐劑的抗原則能使效價趨勢再次往上提升；Bizhanov et al., (2004) 的實驗結果顯示，經兩次含佐劑的注射過程後，專一性抗體效價甚至能維持穩定強度長達 20 週；Chalghoumi et al., (2008) 以雞隻生產針對沙門氏菌的 IgY，經過三次皆含佐劑的抗原免疫注射後，抗體效價呈現上升的趨勢達 10 週才開始有逐漸減弱的趨勢，3 週後再進行免疫注射（含 FIA）則又能使抗體效價有效提升；而 Araujo et al. (2010) 也同樣分別以 FCA 與 FIA 參與不同階段的免疫注射，但在後續階段的注射則是以含 FIA 的抗原注射為主，再以小量且不含佐劑的抗原密集注射為輔，其抗體效價約可維持 5 週左右，與本實驗結果中所呈現的效價表現相似；Palaniyappan et al. (2012) 採用 100 μg 的抗原劑量，共進行兩次注射，抗原分別含 FCA 與 FIA，並無其他的注射步驟，其結果顯示抗體效價歷經上升較為緩慢的一級反應與增幅較激烈的二級反應後，於第八週達到最高峰，有效雞蛋收集時間為 4 週，也與本實驗的結果相似。雖然各個前人研究中採用的抗原種類與劑量皆不盡相同，但佐劑確實對於引發母雞的免疫反應具有相當程度的重要性，

能刺激專一性抗體效價的提升與延長免疫效果，而不含佐劑的免疫注射雖然無法有效提升抗體效價，但仍有維持抗體效價穩定的功效。目前以生產 IgY 為主的生技公司也是在每次注射的抗原中添加佐劑（陳昌平，華肝基因股份有限公司；personal communication），以維持效價穩定，本實驗除了前二次免疫注射有添加佐劑之外，後續的注射則無添加佐劑，可能是造成免疫效果不如預期的原因，如第二次激活注射後的抗體效價趨勢並無顯著提升，僅有維持強度的態勢，未來可針對此進行改良，在每個注射階段的抗原中皆添加佐劑，將可讓效價提升更為明顯。

當母雞首次受到免疫注射後，表現在血液中的抗體以 IgM 為主 (Hamilton et al., 1994)，而濾泡膜上並無 IgM 受體可將 IgM 輸入蛋黃內儲存，因此造成在第二針注射前，血清中抗體效價上升的變化較蛋黃明顯（圖一、圖二），第二次免疫注射後，由於 IgY 成為母雞體內大量表現的抗體，方能藉蛋黃膜上的 IgY 受器送入蛋黃中儲存，也造成抗體效價上升情形較第一次免疫注射後猛烈（圖二）。母雞體內 IgY 經由血液循環送至卵巢，與濾泡膜上的特定抗體受器結合而引起胞吞作用，往膜內形成小囊泡將 IgY 送入蛋黃內儲存，提供胚胎抵禦外來抗原的能力 (Brambell, 1966; Wild, 1975; Rodewald et al., 1982; Tressler et al., 1987)。Patterson et al. (1962) 首先在 1962 年提出母雞血

液中的抗原專一 IgY 傳送到蛋黃中儲存大約有一週的延遲時間，Woolley et al. (1995) 則認為此延遲時間約為 3～4 天，而從本實驗圖三的結果可見在第一次注射到第二次激活注射之前的期間內，延遲時間大約為 5～7 天，並且血清與蛋黃中專一性 IgY 呈現相似的變動趨勢。

我們以免疫轉漬實驗分析（圖四 B）檢測蛋黃中的抗原專一 IgY 對不同來源之免疫球蛋白的辨識情形，發現對鼠的 IgG1 有較強的活性，對兔 IgG1 的活性則相對微弱，對羊的 IgG1 則幾乎不會辨識。我們比對小鼠 IgM、小鼠 IgG1、兔 IgG1、羊 IgG1 重鏈部分的胺基酸序列（表二），發現後三者與小鼠 IgM 間皆有約 30%相同（identities）及約 50%相似（similarities），或許此即為 IgY 會辨識兔免疫球蛋白的原因。同樣藉免液轉漬實驗檢測 IgY 對小鼠各型免疫球蛋白的辨識情形（圖四 D），發現抗原專一性的 IgY 可辨識 IgM、各型 IgG 重鏈以及 κ 輕鏈，還可對 IgA 重鏈、λ輕鏈有微弱的反應，推測由於目前所使用的 IgY 樣品尚未經過純化，其內含有可辨識各式各樣抗原的 IgY，未來以抗原吸附管柱進行純化，推測將可獲得專一性及純度皆有顯著提升的 IgY 樣品。

從本研究的結果可知，在我們選擇的抗原劑量範圍內，注射300 μg抗原可獲得最佳的免疫效果，並且有效雞蛋的收集時間為38天，再

次激活注射則能幫助延長雞蛋收集達40天，雞蛋中的有效IgY經實驗證實可於ELISA（圖一、二）與免疫轉漬實驗（圖四）中辨識抗原，未來再經後續純化將可提高IgY純度及專一性，以利應用於免疫實驗、醫事檢驗等領域，或是將專一性IgY用於純化小鼠單株抗體；再者，本研究所採用的免疫注射流程將可做為未來藉雞隻蛋黃生產哺乳類動物免疫球蛋白之多株抗體的參考。

表一、各種生產雞隻專一性 IgY 的注射過程。

	Animal	Age	Antigen	Immunization schedule (dose/adjuvant/time)
Svendsen Bollen et al. (1996)	Rhode Island Red hens	21	human IgG	1) 100 μg/FCA/day1; 100 μg/FIA/week 27. 2) 100 μg/FIA/day1; 100 μg/FIA/week 27. 3) 100 μg/IM/day1; 100 μg/IM/week 27. (3 groups) -boosted monthly with 100 ug antigen in saline in the interval
Bizhanov et al., (2004)	Brown Hisex hens	25	Sendai virus	100 μg/FCA/day1; 100 μg/FIA/day 27. (1 group)
Chalghoumi et al., (2008)	ISA Brown hens	21	*Salmonella Enteritidis, Salmonella Typhimurium*	1) 100 μg/FCA/day1; 100 μg/FIA/day 22, 43, 134. 2) 10 μg/IM/day1; 10 μg/IM/day 22, 43, 134. (2 groups)
Araujo et al. (2010)	white leghorn hen	25	*Bothrops* venom	30 μg/FCA/day1; 30 μg/FIA/day 14; 10 μg/no adjuvant/day 21, 23, 25. (1 group) repeat the cycle at week 8th/9th and 14th/15th beginning with the FIA dose.
Palaniyappan et al. (2012)	white leghorn hen	23	SARS-CoV nucleocapsid protein	100 μg/FIA/day1; 100 μg/FIA/day 14. (1 groups)
This study	white leghorn hen	50	mouse IgM mAb	0, 30, 100, 300 μg/FCA/day1; 0, 30, 100, 300 μg/FIA/day 30; 0, 15, 50, 150 μg/no adjuvant/day 44, 82. (4 groups)

表二、小鼠IgM重鏈與小鼠、兔、羊IgG1重鏈之胺基酸序列的BLAST結果。

Identities / Similarities	Mouse IgM	Mouse IgG1	Rabbit IgG1	Goat IgG1
Mouse IgM		31%	29%	35%
Mouse IgG1	47%		61%	66%
Rabbit IgG1	50%	78%		69%
Goat IgG1	56%	78%	79%	

Mouse IgM：GenBank Accession no. ABP35934.1

Mouse IgG1：GenBank Accession no. AAB59657.1

Rabbit IgG1：GenBank Accession no. AAB59265.1

Goat IgG1：GenBank Accession no. AAX45026.1

第五章 抗原吸附層析純化蛋黃中 IgY

（Purification of chicken IgY using antigen-adsorption chromatography）

第一節 摘要

本研究收集了含有對應小鼠 IgM 的專一性 IgY 樣品後，為提升 IgY 抗體的應用價值，我們針對蛋黃中的專一性抗體進行純化。我們利用遺傳工程的方式生產出小鼠 IgM 重鏈（C_H2+C_H3）的重組片段，再與具有 N-hydroxysuccinimide esters（NHS）活性位的膠體顆粒接合，製備出抗原吸附管柱以純化對抗原具專一性的 IgY，此特定 IgY 約佔蛋黃中 IgY 的 0.8%，效價則提升為純化前的 17 倍以上，藉免疫轉漬實驗及 ELISA 分析此 IgY，發現可辨識小鼠 IgM 與 IgG 各亞型的重鏈蛋白，但不會與兔、羊的免疫球蛋白作用，亦不會與小鼠的κ、λ輕鏈及 IgA 重鏈反應，是以本研究的純化方法可提升抗體樣品的專一性，也適用於生產高純度、高效價的 IgY 樣品。

第二節 緒言

純化哺乳類免疫球蛋白時常使用的 protein A/G，是藉金黃色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）的 protein A、鏈球菌（*Streptococcal species*）的 protein G 與免疫球蛋白的 Fc 端結合，以便分離抗體、進行純化，但鳥類 IgY 與哺乳類 IgG 的 Fc 端胺基酸序列有顯著差異，使得 IgY 無法與 protein A/G 產生鍵結(Schade, R. et al., 2005)，造成純化上不如哺乳類動物便利。一般在製備蛋黃 IgY 樣品的過程中，去脂為首要步驟，再以鹽析方式將蛋白質沉澱、回溶，之後再進行層析純化，以提高 IgY 樣品的純度(Schade, R. et al., 2005)，由抗原製備的吸附管柱則可用於純化對應於抗原的 IgY，獲得純度、效價與專一性皆優良的抗體樣品。

在此前，本實驗團隊以小鼠單株抗體（IgM,κ）為抗原注射雞隻，收集蛋黃並萃取抗體，為純化其中對應抗原的 IgY，我們藉遺傳工程生產關於抗原的重組片段，以此重組蛋白質製成抗原吸附管柱。

由大腸桿菌生產重組蛋白質甚為方便，毋須提供昂貴的碳源、生長速度快、容易大量培養、細胞可在高密度下進行發酵作用，僅需方便、簡易的遺傳工程技術即可進行基因選殖與表現重組蛋白質，然而快速且大量表現外插的目標蛋白質，會造成細菌代謝上的負荷(Hoffmann et al., 2004)，同時無法正確形成必要的雙硫鍵(Basu et al.,

2011)，導致產出的蛋白質容易形成不正確或不完全的摺疊狀態，以不可溶的形式堆積在細胞內形成包涵體(Villaverde et al., 2003)，故必須使用變性劑如 8 M Urea、4～6 M Guanidium hydrochloride（GdnHCl）、0.3–5%（v/v）*N*-lauroylsarcosine 等破壞錯誤的摺疊結構(Phan et al., 2011)，再進行復性（refolding）以去除溶液中的變性劑，使蛋白質回復到正確的摺疊狀態。復性的方法主要有三種：稀釋法、透析法與管柱層析法等(Phan et al., 2011)。包涵體形式存在的蛋白質無法用於管柱製備，須經過復性的步驟使其轉變為水溶性的蛋白質，目前也有不經過復性，直接將包涵體溶解在 6 M GdnHCl 後進行管柱製作的成功案例(Zhou et al., 2005; Zhao et al., 2006)。

由抗原製備的吸附管柱雖能獲得純度與專一性兼備的抗體樣品，但有鑑於相對珍貴的蛋白質不適宜用於製備管柱，因此本研究發展由重組蛋白質製備吸附管柱，將可有效降低純化抗體的成本，從蛋黃粗萃液中純化出能對應抗原的 IgY 樣品，同時提升抗體純度、效價與專一性，將能增加抗體的應用價值，而在本研究中嘗試許多方法來克服包涵體對管柱製作的困擾，將能成為包涵體的復性或進而製備管柱的參考辦法。

第三節 材料與方法

1. 萃取 Balb/c 小鼠 B 細胞 mRNA

培養單株抗體（IgM,κ）的融合瘤細胞（hybridoma cells），取其含細胞的 10 mL 培養基，室溫下離心 5 分鐘（400 ×g）後謹慎倒棄上清液，保留沉澱的融合瘤細胞。加入 1 mL Trizol reagent（Invitrogen，15596-018）懸浮細胞，並轉移至一乾淨的 1.5 mL 微量離心管，震盪混合均勻後，置於室溫反應 5 分鐘，再加入 0.2 mL 氯仿（chloroform）震盪 15 秒，靜置反應 5 分鐘，接著在 4℃中離心 15 分鐘（12,000 ×g），取出上層無色的透明液體至新的微量離心管，並加入等體積之異丙醇（isopropanol），置於室溫反應 10 分鐘，離心（12,000 ×g，4℃，10 分鐘）後保留沉澱在管底的 RNA。加入 0.5 mL 的 75%酒精（由 DEPC-treated water 配製）至離心管中懸浮沉澱物，離心後（7,500 ×g，4℃，5 分鐘）保留沉澱物，再加入 100 μL DEPC-treated water（1 mL DEPC 加至 1 L 二次水，在 37℃反應過夜後，使用滅菌釜高溫高壓滅菌）回溶沉澱物，利用微量分光光譜儀（THERMO，NanoDrop ND-1000）定量並分裝、保存於–80℃。

取 5 μL RNA 使用 SuperScript ™ Ⅲ Reverse Transcriptase（Invitrogen，18080093）反轉錄為 cDNA，再進行聚合酶連鎖反應選殖目標基因的序列。

2. 聚合酶連鎖反應（Polymerase chain reaction, PCR）

本實驗為求目標核苷酸片段為許多已發表的序列中相對保守的部份，從 IgM（GenBank，ABP35934.1）重鏈的固定端選殖出 IgM-HC〔△（C_H2＋C_H3）〕的核苷酸序列，並設計 Forward primer 5′-CCGGCATATGGCAGAGATGAACCCCAATGT -3′以及 Reverse primer 5′- CCGGCTCGAGCCTCTCGGTCACCAGGTGTG-3′兩條引子，底線標示為限制酵素切割位，分別為 Nde 1（CATATG）及 Xho 1（CTCGAG）。使用 PCR 技術〔2.5 mM dNTP（BERTEC，BTCP-2.5M），10× Taq buffer, 2 U Taq polymerase（Violet，VIO-T805）, 5 μL cDNA，0.2 μM Forward primer，0.2 μM Reverse primer〕將目標基因片段擴增。PCR 溫度循環機設定為 94℃/ 2 分鐘，1 循環；94℃/ 30 秒、66℃/ 30 秒、72℃/ 1 分鐘，共 40 循環；72℃/ 7 分鐘，1 循環，PCR 完成後置於 4℃保存。

3. DNA 電泳與純化目標 DNA 片段

在水平電泳槽內放入預先製作好的 1.2%瓊脂膠體〔1.2%（w/v）Agarose in TAE buffer（40mM Tris, 20mM acetic acid, and 1mM EDTA）〕並注入 TAE buffer 至剛好淹過瓊脂膠體。取適量目標 DNA 與 1/5 倍體積的 6x DNA loading dye（BERTEC，BCTD01）混合均勻，填裝至

瓊脂膠體中，以 100 V 電壓進行電泳 30 分鐘，接著將膠片浸泡在 EtBr（5 μg/mL）中 10 分鐘，隨後在去離子水中褪染 10 分鐘，即可在 UV 燈照射下觀察。

對照目標 DNA 片段與 DNA ladder，將大小正確的電泳條帶用刀片切下，裝入 1.5 mL 微量離心管，利用 Gel/PCR DNA Isolation System（Viogene，GP-1002）純化目標 DNA，接著使用微量分光光譜儀（THERMO，NanoDrop ND-1000）定量 DNA 並保存於 4℃。

4. 萃取質體 pET-24a 之 DNA

將冷凍保存的 pET-24a in XL1-blue 塗抹於固態 LB/Kan 培養基（LB 配方如附錄五，其中含 50 μg/mL Kanamycin）培養後，挑選單一菌落到 5 mL 液態 LB/Kan 培養基（配方見附錄五）培養，放置於 37℃恆溫箱中震盪（200 rpm）培養 14~16 小時後，取適量菌液用 Mini-M^{TM} Plasmid DNA Extraction System（VIOGENE，GF-1002）抽取質體，接著使用微量分光光譜儀定量質體 DNA，並置於 4℃冰箱備用。

5. 限制酵素反應

分別取適量的質體 DNA 與欲殖入的 DNA 片段，各加入 Nde 1（10 U /1 μg DNA，BioLabs，R0111S）與 Xho 1（10 U /1 μg DNA，

BioLabs，R0146S），以及 NBE buffer 與無菌 ddH_2O，置於 37℃恆溫箱中，反應 3 小時，經由 1.2% 瓊脂膠體電泳（100V，30 分鐘），在 UV 燈下觀察並切下各別膠條，並用 Gel/PCR DNA Isolation System 純化 DNA，使用微量分光光譜儀定量後儲存於 4℃備用。

6. 選殖載體構築

取 50 ng 經限制酵素切割的 pET-24a 與經由同樣限制酵素切割的 DNA，以 1:4 的莫耳數比混合均勻，並加入無菌去離子水將體積調整至 10 μL，在 60℃水浴 10 分鐘，立即插入冰上 2 分鐘，隨後加入 T4 ligase buffer 與 T4 ligase（BioLabs，M0202S），再以無菌去離子水將體積調整至 20 μL，在 16℃恆溫箱中進行嵌合反應（ligation）過夜，反應結束後取少量以 1.2%瓊脂膠體電泳觀察選殖載體構築結果，其餘存入 4℃備用。

7. 製備大腸桿菌勝任細胞（competent cell）

以接種環挑選大腸桿菌 XL1-Blue 單一菌落，接種在 5 mL 已添加抗生素的 LB/Tet 液（含 15 μg/mL Tetracyclines）中，在 37℃中震盪（200 rpm）培養 14～16 小時。取 2 mL 菌液加到含 200 mL LB（Tet, 15 μg/mL）的 1 L 錐形瓶，繼續培養 4～6 小時直到其 OD_{600} 吸光值達 0.8～1.0 為止。將培養好的菌液置於 4℃中 15 分鐘，接著在 4℃中離

心（2000 ×g）10 分鐘，倒棄上清液，加入 80 mL 預冷無菌水懸浮菌體，再以相同條件離心、倒棄上清液，隨後以 16 mL 10％（v/v）無菌甘油回溶菌體，相同條件離心、倒棄上清液，以 1.2 mL 10％（v/v）無菌甘油回溶菌體，將菌液每 40 μL 分裝至一 1.5 mL 微量離心管，以液態氮急速冷凍後，置於–80℃保存。

8. 將選殖載體轉形至勝任細胞

將 40 μL 勝任細胞（XL1-Blue）與 10 ng 選殖載體混合，填裝至已預冷且寬度為 1 mm 的電穿孔反應管（BIO-RAD，165-2089）內，以 1.25 kV、200Ω、25 μF 的電擊條件進行電穿孔反應（BioRed gene pulser II）。取 1 mL LB 培養液輕微混合電穿孔反應管內的菌液，吸出至培養管中，於 37℃生長箱內震盪培養一小時。於無菌操作台內吸取 200 μL 菌液，均勻塗抹在固態 LB/Kan 培養基（50 μg/mL Kanamycin）上，待菌液風乾後，倒置在 37℃生長箱培養 14～16 小時。挑選成功生長的菌落並分別接種至固態培養基以及液態培養基內。抽取載體並以 DNA 電泳確認植入的載體 DNA 大小，挑選載體 DNA 大小正確的菌株送定序檢驗，並同時冷凍保存該菌株。

9. 大腸桿菌表現菌株製備

挑選 *E.coli* strain：BL21(DE3)、BL21(DE3)pLysS 以及 Rosetta(DE3)

的單一菌落，接種在已添加適當抗生素的 5 mL LB 液〔BL21(DE3) 不加抗生素；BL21(DE3)pLysS、Rosetta(DE3)：34 μg/mL Chloramphenicol（Cam）〕中，37℃環境中震盪（200 rpm）培養 14~16 小時，取 2 mL 菌液加到已各添加適當抗生素的 200 mL LB 液中，繼續培養 4～6 小時，直到其 OD_{600} 吸光值達 0.8～1.0。將菌液置於 4℃ 中 15 分鐘，接著在 4℃ 中離心 10 分鐘（2000 ×g），倒棄上清液，加入 80 mL 預冷無菌水懸浮菌體，再以相同條件離心、倒棄上清液，隨後以 16 mL 10%（v/v）無菌甘油回溶菌體，相同條件離心、倒棄上清液，以 1.2 mL 10%（v/v）無菌甘油回溶菌體，將菌液每 40 μL 分裝至一 1.5 mL 微量離心管，在液態氮中急速冷凍，保存於–80℃。

10. 將選殖載體轉形至表現菌株

培養成功轉形的 pET-24a/ IgM-HC in XL1-blue，抽取載體並使用微量分光光譜儀定量。取 10 ng 載體 DNA 分別添加到置於冰上預冷的 40 μL 三種大腸桿菌表現菌株〔BL21(DE3)、BL21(DE3)pLysS 以及 Rosetta(DE3)〕中，使用 BioRed gene pulser II，以 1.25 kV、200Ω、25 μF 的條件進行電穿孔反應。取 1 mL LB 培養液輕微混合電穿孔反應管內的菌液，吸出至培養管中，於 37℃ 生長箱內震盪培養一小時後，於無菌操作台內吸取 200 μL 菌液，均勻塗抹在固態 LB/Kan 培養

基上，待菌液風乾後，倒置在 37℃生長箱培養 14～16 小時。挑選成功生長的菌落進行誘導表現測試並冷凍保存菌株。

11. 誘導表現重組蛋白質

將三種皆成功植入 pET-24a/ IgM-HC 的菌株分別接種至 5 mL 液態 LB/Kan 培養基內，於 37℃生長箱內震盪（200 rpm）培養 14～16 小時。在 6 個 50 mL 錐形瓶中各別加入 10 mL LB/Kan，將每種菌液分別取 100 μL 至其中兩個錐形瓶內，震盪培養 3 小時或待 OD_{600} 吸光值達 0.5～0.7 之間，在各菌株的其中一個錐形瓶中加入 100 μM IPTG（Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside），放回 37℃恆溫箱中繼續震盪培養 4 小時，以誘導大腸桿菌生成 rIgM-HC。從各錐形瓶中取出 1 mL 菌液至 1.5 mL 微量離心管，離心（10,000×g，10 分鐘）使菌體沉降，丟棄上清液，加入 200 μL SDS sample buffer〔62.5 mM Tris-Cl, pH 6.8, 2%(w/v)SDS, 5%(v/v)β-mercaptoethanol, 10%(v/v)Glycerol〕並以超音波均質機（Misonix Ultrasonic cell disruptor XL）將菌體打碎（功率輸出設定為 4 W，震盪 20 秒即休息 20 秒，共兩個循環），蓋上離心管管蓋與套上防爆夾後放在沸水中水浴 5 分鐘，即進行澄清（16,000 ×g 離心，10 分鐘，4℃）、回收上清液，並以 SDS-PAGE 檢測重組蛋白表現情形。

12. IPTG 濃度對誘導表現效果測試

以接種環分別挑選含選殖載體的 BL21(DE3)至 5 mL 液態 LB/Kan 培養基內，於 37℃生長箱內震盪（200 rpm）培養 14～16 小時，經此條件培養的菌液稱之為 preculture cells。各取 100 μL 的 preculture cells 至已添加 10 mL 液態 LB/Kan 培養基的六個 50 mL 錐形瓶中，於 37℃生長箱內震盪培養 3 小時或待 OD_{600} 吸光值達 0.5～0.7 時後，分別在 6 個錐形瓶中加入 0、3、10、30、100、300 μM IPTG 進行誘導表現，震盪培養 4 個小時，同樣以上述方式將萃取菌體中的蛋白質，並以 SDS-PAGE 檢測重組蛋白表現情形。

13. 大規模誘導重組蛋白質並確認細菌內的存在形式

培養 preculture cells 後，取 1 mL 至 100 mL 的液態 LB/Kan 培養基內，於 37℃生長箱內震盪培養 3 小時或待 OD_{600} 吸光值達 0.5～0.7 之間，加入 30 μM IPTG 後繼續震盪培養 4 小時，誘導表現重組蛋白質。將誘導後的菌液以 5,000 ×g、4℃離心 15 分鐘，移除上清液後，加入 10 mL Ni-NTA native binding buffer（20 mM Tris-Cl , pH 7.8, 0.5 M NaCl, 5 mM Imidazole）懸浮菌體並置於冰上，隨後以超音波均質機震盪 30 秒、休息 30 秒為 1 周期，共重複 10 周期進行破菌（功率輸出設定為 6 W）。菌液離心（16,000 ×g，20 分鐘，4℃）後收集上

清液即為細菌的水溶性蛋白質，另以 10 mL Ni-NTA native binding buffer 懸浮沉澱物，再次離心後倒棄上清液，接著以 5 mL Ni-NTA denature binding buffer（6 M Urea, 20 mM Tris-Cl , pH 7.8, 0.5 M NaCl, 5 mM Imidazole）懸浮沉澱物，並於 4℃內震盪過夜，隔日離心後收集上清液，此即為細菌蛋白質的非水溶性部分。收集菌體蛋白質水溶與非水溶性部分後，以 SDS-PAGE 重組蛋白的表現情形。

14. 萃取重組蛋白質

以大規模誘導重組蛋白質的方式培養 100 mL 菌液，離心（6,500 ×g，15 分鐘，4℃）沉降菌體後，以 10 mL Wash IB buffer（20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100)懸浮之並置於冰上，以超音波均質機（功率輸出設定為 6 W，震盪 30 秒即休息 30 秒，共十個循環）破菌，隨後以離心處理（10,000 ×g，10 分鐘，4℃）使非水溶性物質沉澱，再以 10 mL Wash IB buffer 懸浮沉澱物，重複上述離心、懸浮沉澱物共兩次，接著以 20 mL 0.1 M MOPS（pH 7.5）懸浮沉澱物及離心，再以 20 mL MOPS-$CaCl_2$ buffer(0.1 M MOPS, pH 7.5, 50 mM $CaCl_2$）懸浮沉澱物，離心後以 1 mL 含 6 M GdnHCl 的 MOPS-$CaCl_2$ buffer 回溶沉澱的蛋白質。在室溫下震盪 1 小時後，藉澄清（16,000 ×g，10 分鐘，4℃）去除無法溶解的物質，上清液即含

有目標重組蛋白質。吸取 100 μl 至一乾淨微量離心管以備分析，其餘則用於吸附性管柱製作。

15. 重組蛋白質定量分析

本實驗的重組蛋白質是以膠體電泳分析進行定量，以 bovine serum albumin（Sigma，A7906）做為參考之標準樣品，但由於本實驗的重組蛋白質皆溶於含 GdnHCl 的溶液中，無法直接進行膠體電泳分析，必須先進行丙酮沉澱蛋白質。

吸取 100 μL 含待測蛋白質含量之樣品至一微量離心管，另加入 4 倍體積之保存於–20℃的丙酮（400 μl），4℃中震盪混合 10 分鐘後，於–20℃中靜置 20 分鐘，隨後以離心（16,000 ×g，10 分鐘，4℃）使蛋白質沉澱，再加入 100 μl PBS 懸浮沉澱，重複丙酮沉澱蛋白質共三次，確實洗去 GdnHCl，最後謹慎將丙酮吸光並風乾，即可加入與原體積相等之 1×SDS sample buffer 回溶沉澱，隨後進行 SDS-PAGE 分析。

16. 製作抗原吸附管柱

吸附性管柱製作材料為 Affi-gel 10（BIO-RAD，153-6046）。將上述溶於 6 M GdnHCl（MOPS- $CaCl_2$ buffer）的重組蛋白質以 0.5 mL/min 滴速加入 5 倍體積之不含 GdnHCl 的 MOPS-$CaCl_2$ buffer，將

其稀釋為 1 M GdnHCl 以符合 Affi-gel 10 所能耐受之 GdnHCl 濃度，同樣吸取 100 μL 至一乾淨微量離心管備用。將其餘重組蛋白液與等體積之 Affi-gel 10 共置於一個可拋式管柱，完全封口後將他們混合均勻，並置於 4℃ 中的均質旋轉儀反應過夜，隔日收集流出液，並加入與膠體等體積之 MOPS-$CaCl_2$ buffer 流洗膠體並另收流出液，加入與膠體等體積之 0.1 M ethanolamine 並置於 4℃ 中的均質旋轉儀兩小時，終止 Affi-gel 10 上的活性位之活性作用。收集之流出液將使用於檢測配體（重組蛋白質）與膠體接合的效率估算。

17. 雞隻免疫注射

請參考第四章-第三節-1。

18.蛋黃的收集與萃取蛋黃中 IgY

蛋黃收集方法請參考第二章-第三節-1，蛋黃液存於一乾淨容器後放入–20℃ 保存；蛋黃解凍後的 IgY 萃取方法請參考第二章-第三節-2，蛋黃稀釋液與氯仿體積比設定為 1:0.5，回收低脂質含量的蛋黃粗萃液，再以 50％硫酸銨飽和度（291 g/ 1L）鹽析沉澱 IgY。

19. 純化專一性 IgY

雞隻經注射後生產的蛋黃保存於–20℃ 中，解凍後以氯仿輔助製

備蛋黃萃取液，並用 50%硫酸銨飽和濃度進行局部純化以收集 IgY 樣品。將此 IgY 樣品注入上述製備之抗原吸附性管柱，靜置於 4℃中過夜，隔日取出後先將管柱內的 IgY 樣品流出，再加入 PBS〔10 mM（w/v）Sodium phosphate, 140 mM (w/v) NaCl, pH 7.4〕流洗管柱，同時以光電比色計（Pharmacia Biotech Gene-Quant II）監測流出液之吸光值（OD_{280}），當流出液之吸光值降至 0.02 以下，即可將管柱內液體流至與膠面齊，加入 2 倍膠體體積之 0.1 M Glycine-Cl（pH 2.5）至管柱中，沖提吸附在管柱上之 IgY。在玻璃試管中加入 1/5 沖提液體積之 0.5 M Tris-Cl（pH 8.5），收集沖提液的同時隨即作用酸鹼中和。在此沖提液中的蛋白質即為對抗原具吸附性的專一性 IgY。

20. 純化後 IgY 樣品對不同抗原的結合能力測試

藉酵素連結免疫吸附法（enzyme-linked immuno-sorbent assay; ELISA）檢測 rIgM-HC 專一性 IgY 對不同抗原的結合情形。將各種抗原以 0.2 M borate saline（配方見附錄四-1）進行稀釋至 27 nM（rIgM-HC 在此濃度下可換算為 1 μg/mL），接著加入 50 μL 至 96 孔的 ELISA 盤（Costar，EW-01959-20）中各孔洞，於室溫下吸附作用 6 小時或 4℃中過夜，吸附完成後以 Wash buffer（配方見附錄四-1）沖洗三次，再加入 180 μL Blocking buffer（配方見附錄四-1）至每格

孔洞中，放置室溫 2 小時或 4℃中過夜；重複沖洗步驟，隨後加入純化後的 IgY 樣品 1 μg/mL（以 ELISA Diluent 稀釋），每格孔洞 50 μL，於室溫反應 2 小時，接著重複沖洗步驟，再於每格孔洞加入 50 μL Rabbit anti-chicken IgY-Alkaline phosphatase（RAC-AP；Jackson，303-055-003，稀釋 5,000 倍使用），放置室溫中反應 2 小時，再重複沖洗步驟，隨後在各孔洞加入 50 μL pNPP 受質（配方見附錄四-1）進行呈色，待呈色完成即以分光光度計（BIO-TEK MQX220）偵測吸光值（$OD_{405-490}$），將吸光值的數據做成直條圖呈現。數據皆為三次重複，並附上標準差（Standard deviation; SD）。

21. IgY 樣品純化前後的抗體效價比較

同樣以 ELISA 進行檢測，比較 IgY 樣品純化前後的抗體效價。將抗原 8H4 以 0.2 M borate saline 由 0.5 μg/mL 進行系列稀釋，接著各加入 50 μL 至 96 孔的 ELISA 盤中各孔，放置 4℃中過夜待抗原吸附作用完成，隨後以 Wash buffer 沖洗三次，再加入 180 μL Blocking buffer 至每格孔洞中，放置室溫反應 2 小時；重複沖洗步驟後，加入 50 μL 以 ELISA Diluent 稀釋至 1 μg/mL 純化前與純化後的 IgY 樣品及不含對應 8H4 能力的 IgY 樣品，於室溫下反應 2 小時後，重複沖洗步驟，再於每格孔洞加入 50 μL RAC-AP，放置室溫中反應 2 小時，

接著重複沖洗步驟，隨後在各孔洞加入 50 μL 的 1.6 μM pNPP 受質進行呈色，待呈色完成即以分光光度計偵測吸光值（$OD_{405-490}$），並以吸光值數據製成曲線圖，以進行效價分析。數據皆為三次重複，並附上標準差。

22.SDS 膠體電泳分析（Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE）

請參考第二章-第三節-6。

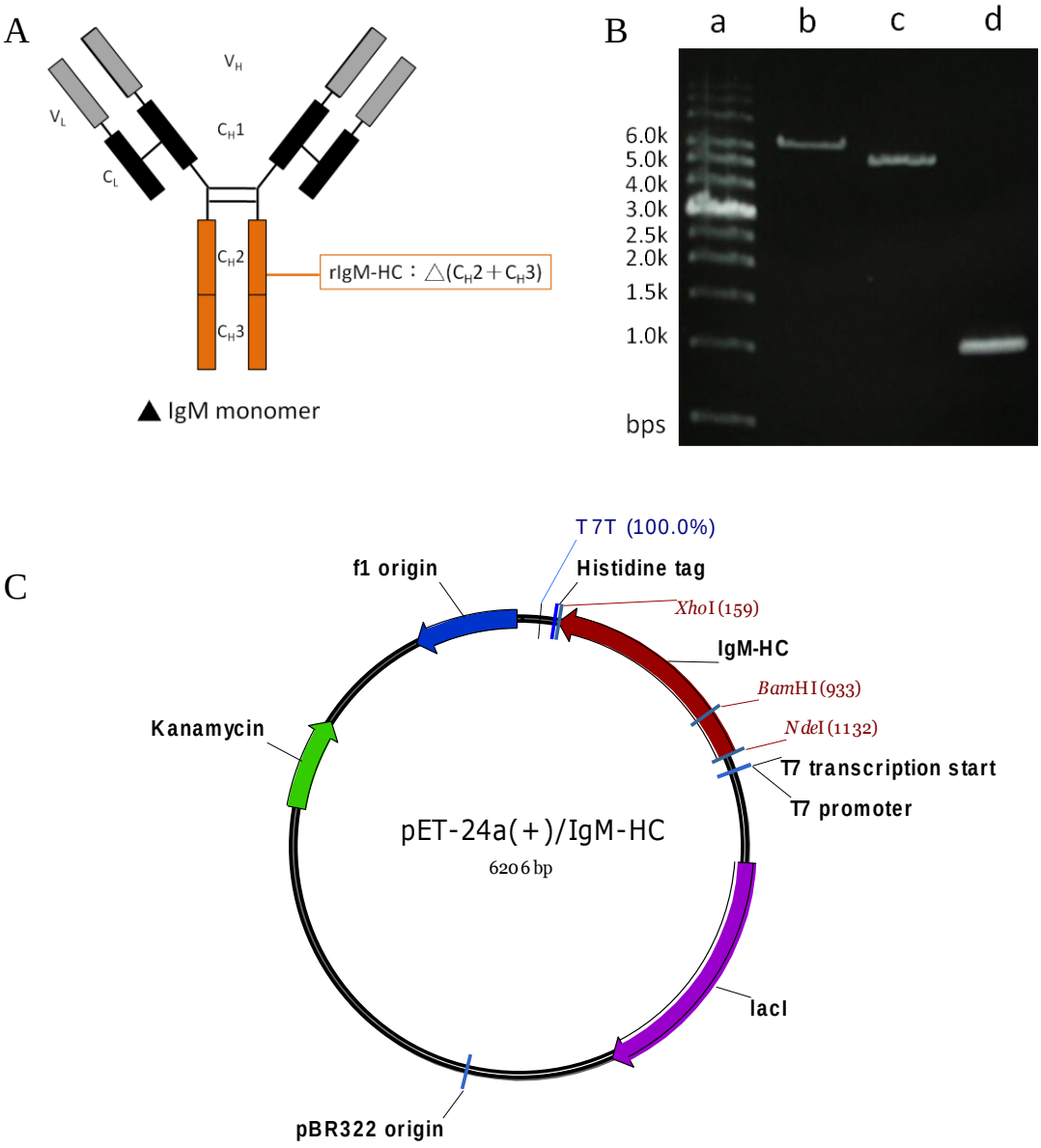
23.免疫轉漬實驗（Immunoblotting; Western blotting）

請參考第四章-第三節-7，在此以純化後的 IgY 樣品（1 μg/mL）做為一級抗體。

第四節 結果

1. 表現載體的構築與大腸桿菌轉殖

本實驗生產的重組蛋白片段－rIgM-HC，是由小鼠 IgM 重鏈的 C_H2 & C_H3 組合而成（圖一 A）。首先反轉錄 Balb/c 小鼠的 mRNA 為 cDNA，利用 PCR 選殖出大小為 966 bps 的 IgM-HC DNA（圖一 B、附錄六），並在序列兩端接上 Nde 1 與 Xho 1 酵素切位，將 Nde 1-IgM-HC- Xho 1 構築至 pET-24a，可得大小為 6206 bps 的表現載體 pET-24a/ IgM-HC（圖一 C），根據表現載體的基因序列判斷，rIgM-HC 一共有 331 個胺基酸，分別由屬於 IgM-HC 序列的 322 個胺基酸、6 個 His-tag 與屬於質體序列的 3 個胺基酸共同組成（圖二）。使用電穿孔法將表現載體導入 BL21(DE3)、BL21(DE3)pLysS 以及 Rosetta(DE3) 後，IPTG 可成功誘導此三種菌株表現 rIgM-HC（圖三），大小為 37 kDa，並且以非水溶性的包涵體形式存在（圖四）。



圖一、rIgM-HC 示意圖、DNA 電泳分析與表現載體圖譜。

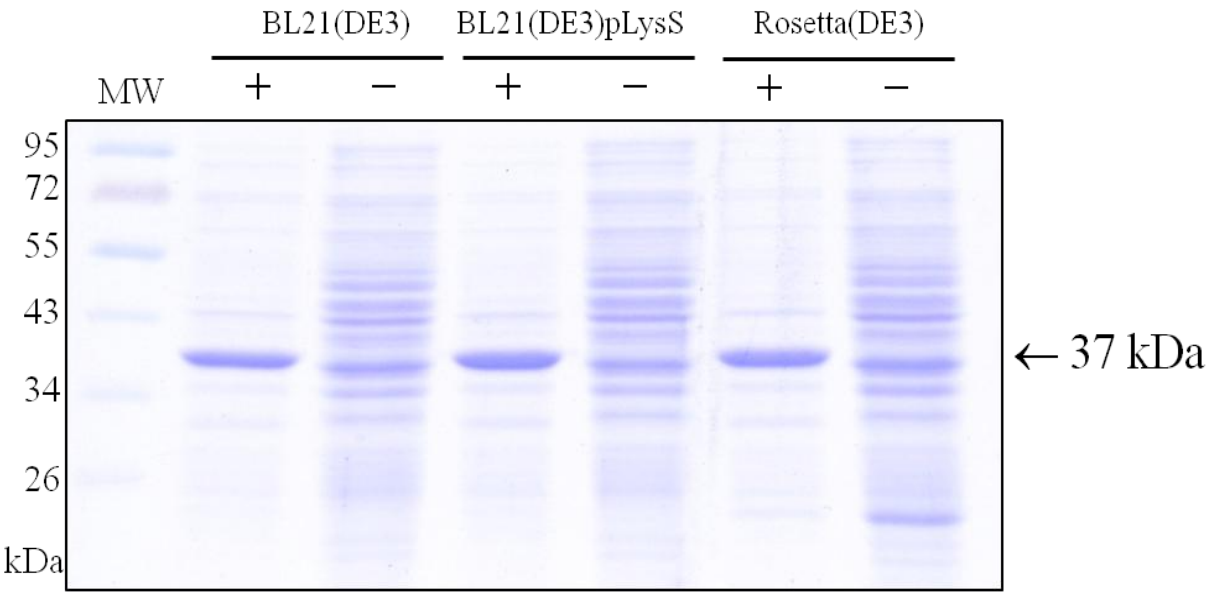
本研究所製作的 rIgM-HC 是依 mu chain constant region C_H2 & C_H3（圖中橘色區塊）的核苷酸序列進行 PCR 片段增值（A）。將 1 Kb DNA Ladder（lane a，BTCM-1000）、pET-24a/IgM-HC（lane b）、pET-24a（lane c）與 IgM-HC（lane d）同時進行 1.2% 瓊脂膠體電泳分析（100 伏特，30 分鐘），可見 IgM-HC（966 bps）與 pET-24a（5240 bps）成

功接合成 6206 bps 的 pET-24a/IgM-HC（B）。IgM-HC 藉由 Nde1 及 Xho1 兩種限制酵素切位組裝於 pET-24a 表現載體中（C），該表現載體具有抗 Kanamycin 基因，轉型後的細菌可於含 Kanamycin 的培養基上進行篩選，在 IgM-HC 基因序列的 5’端具有 His-tag 序列，有利於重組蛋白質的純化操作。

MAEMNPNVNVFVPPRDGFSGPAPRKSKLICEATNFTPKPIT
VSWLKDGKLVESGFTTDPVTIENKGSTPQTYKVISTLTISEID
WLNLNVYTCRVDHRGLTFLKNVSSTCAASPSTDILTFTIPPSF
ADIFLSKSANLTCLVSNLATYETLNISWASQSGEPLETKIKIM
ESHPNGTFSAKGVASVCVEDWNNRKEFVCTVTHRDLPSP
QKKFISKPNEVHKHPPAVYLLPPAREQLNLRESATVTCLVKG
FSPADISVQWLQRGQLLPQEKYVTSAPMPEPGAPGFYFTH
SILTVTEEEWNSGETYTCVVGHEALPHLVTERLEHHHHHH

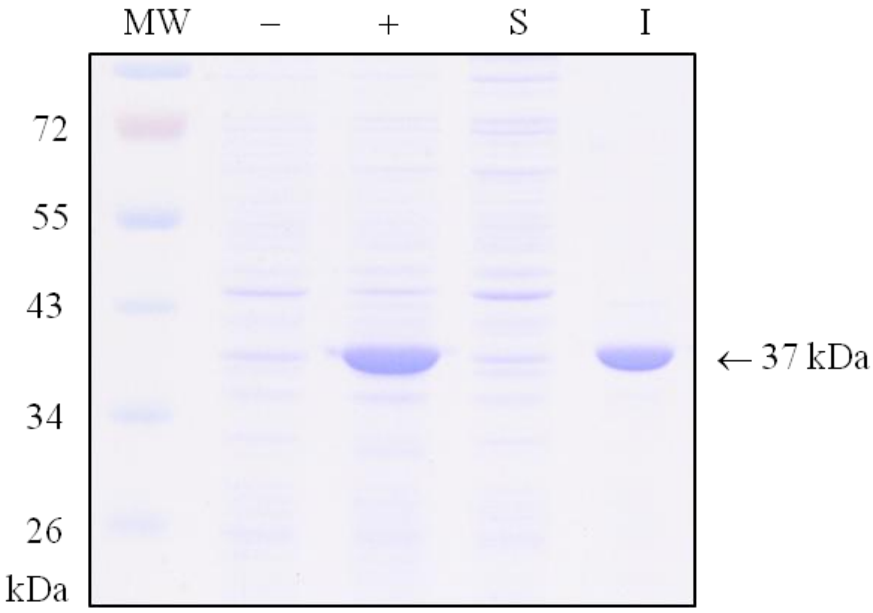
圖二、rIgM-HC 的胺基酸序列。

rIgM-HC 胺基酸序列中共有 331 個胺基酸，包含 322 個胺基酸（紅棕色）屬於小鼠 mu chain constant region（C_H2 & C_H3），另有 9 個胺基酸屬於質體本身（黑色＋綠色），其中 6 個是 His-tag（綠色）。



圖三、rIgM-HC 在三種大腸桿菌菌株表現情形。

將 pET-24a/IgM-HC 載體分別轉形至 BL21(DE3)、BL21(DE3) pLysS 以及 Rosetta(DE3)後，加入 100 μM IPTG（＋）誘導表現重組蛋白質 rIgM-HC，隨後以 SDS sample buffer 萃取全菌蛋白質後，進行 12%膠體電泳與 CBB 染色分析，可見三種表現菌株皆可表現 rIgM-HC，分子量約為 37 kDa（圖右箭頭所指位置），無添加 IPTG 的處理組（－）則無表現。MW 為蛋白質分子量標準品（Bioman，PREP1025）。

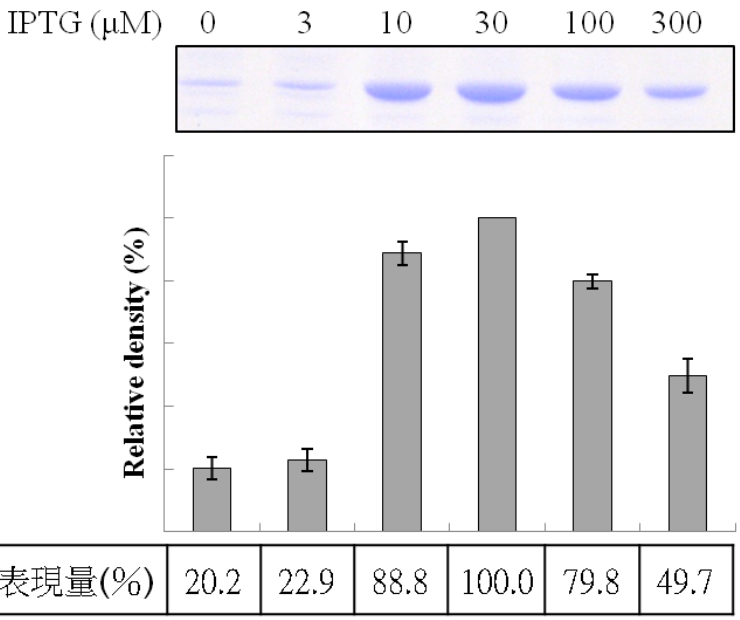


圖四、rIgM-HC 在菌體中表現的存在形式。

將含有 pET-24a/IgM-HC 的 BL21(DE3)分別處以未加入 IPTG 誘導(－)及加入 100 μM IPTG 誘導（＋）後，萃取全菌蛋白質，另外將經誘導處理的菌液分別萃取水溶性（S）與非水溶性成分（I），再取等體積的四種樣品進行 12% SDS-PAGE 與 CBB 染色分析，由此可見 rIgM-HC 經誘導表現後是以非水溶性的包涵體形式存在。MW 為蛋白質分子量標準品（Bioman，PREP1025）。

2. 以 IPTG 誘導細菌表現 rIgM-HC 的情形

為檢測誘導重組蛋白表現的最佳 IPTG 濃度，我們在含表現載體的 BL21(DE3)菌液中，分別添加一系列濃度的 IPTG，經過 4 小時的誘導培養，以 SDS sample buffer 萃取全菌蛋白質，並進行 SDS-PAGE 與 CBB 染色，再使用影像處理系統（Multi Gauge V2.1）對重組蛋白的染色密度進行量化分析。圖五顯示 rIgM-HC 使用 30 μM IPTG 誘導，即可使細菌有最高表現量，再增高 IPTG 濃度也不會再增加 rIgM-HC 表現量，本研究後續的 rIgM-HC 誘導表現實驗皆添加 30 μM 的 IPTG。



相對表現量(%)	20.2	22.9	88.8	100.0	79.8	49.7

圖五、IPTG 濃度對 rIgM-HC 表現的影響。

在含 pET-24a/IgM-HC 載體的 BL21(DE3)菌液中，分別添加 IPTG 至如圖中所示的各種濃度（0~300 μM），經 4 小時於 37℃震盪培養（200 rpm）後，以 SDS sample buffer 萃取細菌蛋白質並進行 SDS-PAGE 及 CBB 染色（圖上部的長框），再以攝影系統（Fujifilm, LAS 3000）及影像分析軟體（Multi Gauge V2.1）將蛋白質的染色密度量化（圖中央的柱狀圖）。此實驗共重複三次，並將表現量最高的蛋白質平均密度（IPTG 30 μM）設定為 100％，進而換算其他誘導濃度的相對表現量（圖下方表格資料）。

3. 抗原吸附管柱製作

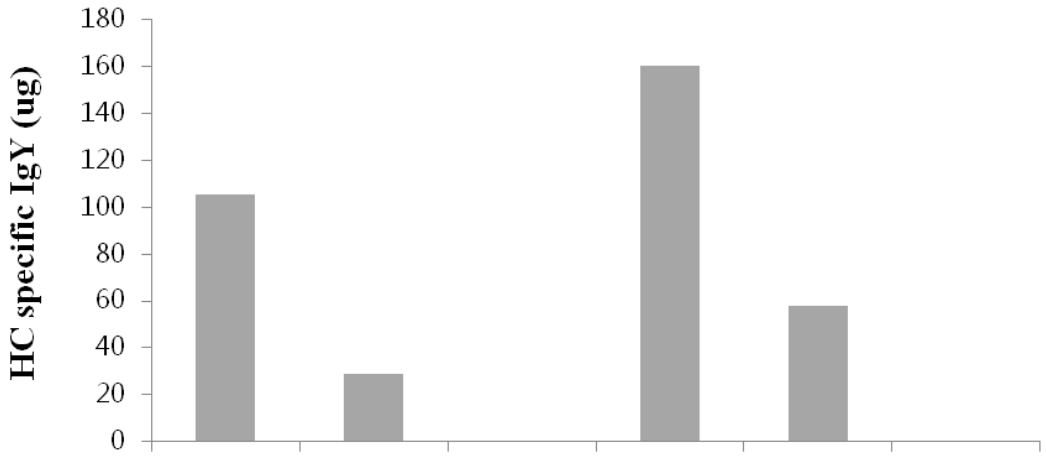
誘導 100 mL 菌液表現 rIgM-HC 後，以 1 mL 6 M GdnHCl 溶液回溶包涵體，再緩慢地將 GdnHCl 逐步稀釋至 1 M，此時共獲得 13.9 mg rIgM-HC，並與 2 mL Affi-gel 10 混合均勻以進行接合反應，反應完全後收集管柱流出液，以減去法估算重組蛋白與膠體接合率為 60.4%，約有 8.4 mg rIgM-HC 成功接合（表一）。

表一、製備 rIgM-HC 吸附管柱的情形

100 mL LB菌液	Total rIgM-HC	Coupled rIgM-HC
protein (mg)	13.9	**8.4**
ratio (%)	100	**60.3**

4. 純化專一性 IgY

首先將大約 16 mg IgY 樣品填裝入 rIgM-HC 吸附性管柱中，隔日沖提出約 105.6 μg IgY（圖六，a1），將流出的樣品液重新填裝入管柱中，再次沖提則只獲得 28.9 μg IgY（圖六，a2），第三次純化則已無抗體可回收（圖六，a3），另填裝未經純化的同批 IgY 樣品 32 mg 至管柱中，第一次沖提獲得 160.6 μg IgY（圖六，b1），回收的樣品液再次填入管柱中，經沖提獲得 57.7 μg IgY（圖六，b2），第三次純化則無回收抗體（圖六，b3），此實驗結果顯示管柱具有吸附、純化抗體之功能，並具重複使用的效果，而平均大約有 0.76%的 IgY 具有對應 rIgM-HC 的專一性。



樣品編號及純化次數	a1	a2	a3	b1	b2	b3
IgY (ug)	105.6	28.9	0	160.6	57.7	0
specific IgY / total IgY (%)	(105.6+28.9) ug / 16 mg x 100% = 0.84 %			(160.6+57.7) ug / 32 mg x 100% = 0.68 %		

圖六、專一性 IgY 的純化情形。

填裝約 16mg IgY 至 rIgM-HC 吸附性管柱中，三次純化過程（a1、a2、a3）分別回收 105.6、28.9、0 μg IgY，另外再填裝約 32 mg IgY 至管柱中，三次純化過程（b1、b2、a3）分別回收 160.6、57.7、0 μg IgY，以此二次純化結果推算，專一性 IgY 所佔比例分別為 0.84％及 0.68％，兩次的平均為 0.76％。

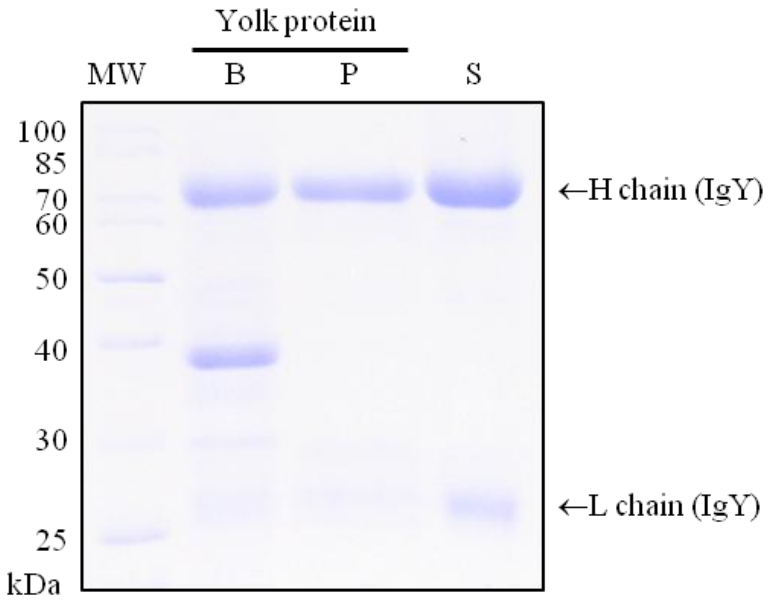
5. 分析純化後的專一性 IgY

將純化後的 IgY 樣品以膠體電泳分析（圖七），同時與純化前的樣品（以 50%飽和度的硫酸銨鹽析沉澱蛋白質）以及標準品 IgY 比較，發現 IgY 樣品經本實驗製作的吸附管柱純化後，純度獲得明顯提升，並且與標準品 IgY 相當。

接著以免疫轉漬實驗測試對不同蛋白質的辨識能力。我們以小鼠、兔、羊的免疫球蛋白及 BSA 進行 SDS-PAGE 及 CBB 染色分析（圖八 A），確認各蛋白質的定量情形一致後，再轉漬蛋白質到 NC 膜上，以純化後的 IgY 樣品進行辨識，圖八 B 可見 IgY 僅對小鼠之免疫球蛋白重鏈部分有反應，隨後再挑選了本實驗室自產的各型單株抗體做為抗原，進一步檢測 IgY 對各型小鼠免疫球蛋白的辨識情形。從圖八 C 可見各種蛋白質的定量情形一致，免疫轉漬實驗的結果則可見抗原專一性 IgY 除了可與 IgM 的重鏈端結合外（圖八 D），尚可與其他同型 IgG 的重鏈蛋白反應，但不會與輕鏈蛋白作用，隨後將等分子數的各種蛋白質吸附在 ELISA 盤上，再以抗原專一性 IgY 樣品做為一級抗體，結果（圖九）顯示純化後的 IgY 樣品對部分蛋白質有活性產生，若將對 8H4 的辨識活性設定為 100%，則對同為 IgM, κ 的 8G6 相對活性為 91.4%，對 rIgM-HC 的活性達 76.4%，對於 1D3（IgG1,λ）、10E4（IgG2a,κ）與 5A1（IgG2b,κ）的相對活性則分別為 49%、42.4

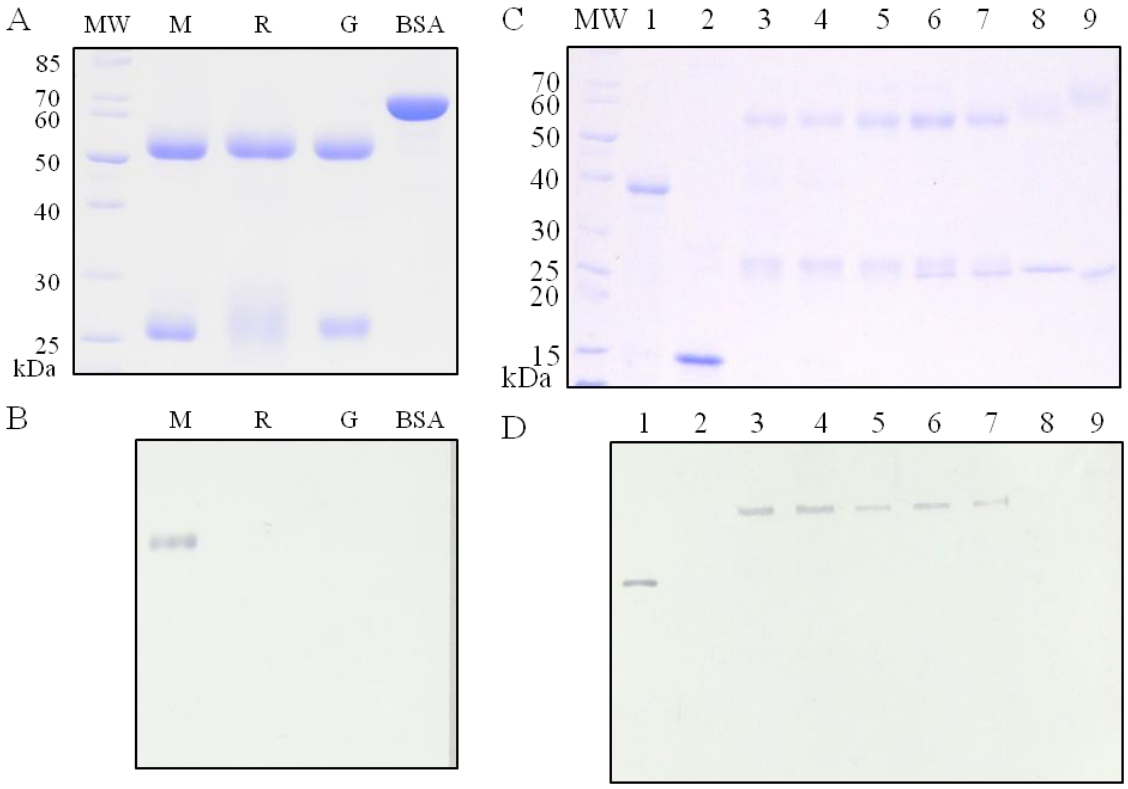
%與 36.7%。

繼續以 ELISA 的方式檢測蛋黃 IgY 樣品在純化前後的效價提升情形。在 ELISA 盤中吸附系列濃度的 8H4 後，分別將純化前後的 IgY 樣品（等濃度）做為一級抗體，比較兩者的抗體效價，由圖十 A 可見純化後的 IgY 樣品之效價較快達到飽和，另取兩曲線中各為直線的部份製成趨勢線（圖十 B），由兩線斜率的比值可知純化前後的 IgY 效價相差近 17.3 倍（160.26÷9.2733＝17.3）。



圖七、IgY 樣品純化前後的蛋白質分布情形。

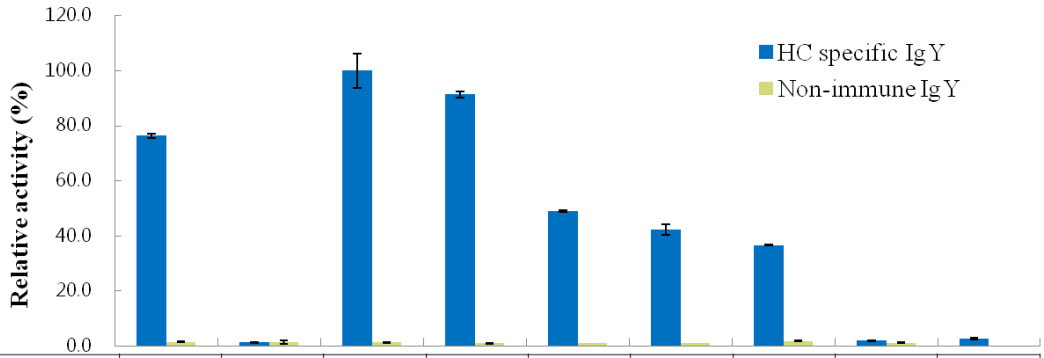
將純化前的 IgY 樣品（B：Before purification，蛋黃粗萃取液的蛋白質經 50%硫酸銨飽和濃度鹽析沉澱）、純化後收集到的 IgY（P：Purified IgY）及標準品 IgY（S：Standard IgY；Jackson，003-000-003），各取 3 μg 蛋白質進行 12% SDS-PAGE 與 CBB 染色分析，觀察純化後樣品的蛋白質分布情形，可見純化後的專一性 IgY 純度較純化前為佳，並且與標準品 IgY 相當。MW 則為蛋白質分子量標準品（Bioman，PL01425）。



圖八、純化後的 IgY 樣品對各型免疫球蛋白的免疫轉漬分析。

首先取 5 μg 小鼠（M，Sigma，I5381）、兔（R，Sigma，I5006）、羊（G，Sigma，I5262）之免疫球蛋白進行 12%SDS-PAGE 與 CBB 染色分析（A），確認各蛋白質的分布並查看蛋白定量情形，稀釋至 0.2 μg 後再進行免疫轉漬實驗（B），以檢測專一性 IgY 對不同來源之免疫球蛋白的辨識情形；另取 3 μg 重組蛋白質與小鼠各型免疫球蛋白進行 8～20%梯度膠 SDS-PAGE 與 CBB 染色分析（C），確認各種蛋白的定量情形後，稀釋至 0.2 μg 後進行免疫轉漬實驗（D）。編號 1～9 分別是小鼠單株抗體 rIgM-HC、rKC（自製的 kappa chain constant region 重組蛋白）、8H4（IgM,κ）、8G6（IgM, κ）、1D3（IgG1,λ）、10E4（IgG2a, κ）、5A1（IgG2b, κ）及 IgA, κ（ICL，RS-90A-K）、IgA, λ

（ICL，RS-90A-L）。MW 為蛋白質分子量標準品（Bioman，PL01425）。

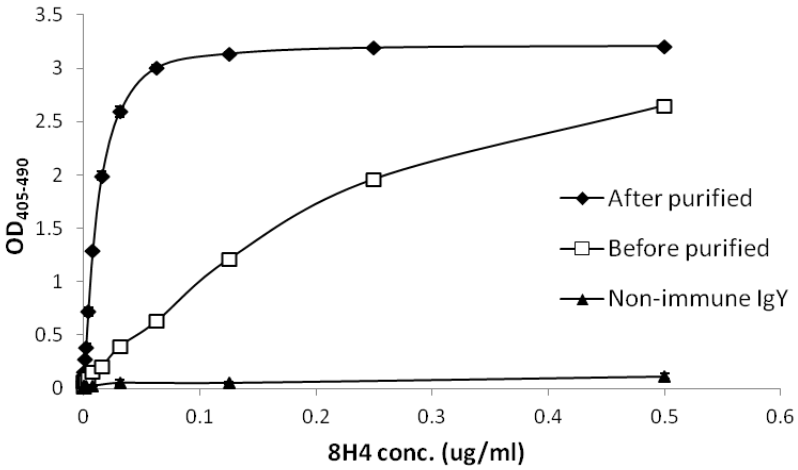


各型蛋白質	rIgM-HC	rKC	8H4 (IgM, κ)	8G6 (IgM, κ)	1D3 (IgG1, λ)	10E4 (IgG2a, κ)	5A1 (IgG2b, κ)	IgA, κ	IgA, λ
Relative activity (%)	**76.4**	**1.4**	**100.0**	**91.4**	**49.0**	**42.4**	**36.7**	**2.0**	**2.8**

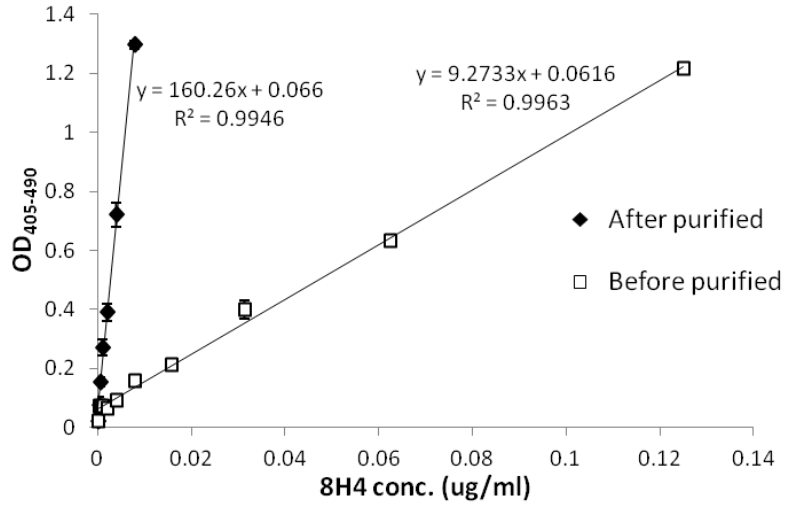
圖九、純化後 IgY 樣品針對各型免疫球蛋白的辨識情形。

以 ELISA 的方式檢測 rIgM-HC 專一性 IgY 對各型免疫球蛋白的辨識情形。使用 rIgM-HC 專一性 IgY（HC specific IgY）與 Non-immune chicken IgY（Non-immune IgY）做為一級抗體。設定各種 Ag 皆為 27 nM（rIgM-HC 在此莫爾濃度下可換算為 1 μg/mL），並將 rIgM-HC 專一性 IgY 對 8H4（IgM,κ）的 $OD_{405\text{-}490}$ 值設定為 100%，進而換算 rIgM-HC 專一性 IgY 對各型免疫球蛋白與重組蛋白的相對活性強度（圖下方表格資料）。結果數值經三次重複並附上標準差。

A



B



圖十、純化前後 IgY 效價表現差異情形。

取等濃度的純化前後 IgY 樣品做為一級抗體，加入已固著系列稀釋 8H4 的孔洞中，檢測兩者的抗體效價差異（A），另取兩曲線中呈直線部分以回歸線分析（B），純化後與純化前的斜率比值可知兩者效價相差 17.3 倍。圖中數值皆由同處理組的三次重複所得平均值及標準誤差。

第五節 討論

本研究使用取得方便、可大量生產的重組蛋白質取代原為單株抗體的抗原製作抗原吸附管柱，我們以大腸桿菌表現小鼠 IgM 重鏈的 C_H2、C_H3 domain，製作重組蛋白質 rIgM-HC（圖一 A），再與 Affi-gel 10 進行接合。Affi-gel 10 是具有 NHS 活性位的瓊脂膠體顆粒，藉此活性位與配體（ligand）上的一級胺構造接合，形成穩定的胺鍵鍵結。本實驗成功利用大腸桿菌生產 rIgM-HC，然而快速並且大量表現人工插入的目標蛋白，會造成細菌代謝上的負荷(Hoffmann et al., 2004)，而使重組蛋白以包涵體形式存在。由於是蛋白質本身摺疊錯誤之故，必須使用變性劑破壞錯誤的摺疊結構，才能順利溶解包涵體，隨後再進行復性使蛋白質回復到正確的摺疊狀態。

復性的方法主要有三種：稀釋法、透析法與管柱層析法等(Phan et al., 2011)，考量到高濃度的蛋白質較有利於管柱製作，因此我們首先選擇使用不會讓蛋白質樣品的體積過份膨脹之透析法。我們以含 0.3 % N-lauroylsarcosine 的溶液回溶重組蛋白後，以 50 倍體積的 $NaHCO_3$-NaCl buffer（0.2 M $NaHCO_3$, 0.3 M NaCl, pH 8.0）多次透析，再藉 Ultra-filtration（10 kDa molecular weight cut-off）濃縮蛋白質樣品，以利用於進行管柱製作，但此次實驗中配體與膠體的接合效率極差，我們推測以水為媒介進行管柱製作會讓 Affi-gel 10 的活性位帶微

弱負電，而 rIgM-HC（pI＝6.4）在 pH 8.0 的 $NaHCO_3$-NaCl buffer 中也帶負電，甚至 N-lauroylsarcosine 殘留也會使 rIgM-HC 帶負電，因此產生電性排斥影響了重組蛋白與膠體活性位接合效果。接著改採逐步透析法，預期在整個透析過程結束後可使重組蛋白在不含變性劑的溶液中保持可溶性的狀態。我們以含 6 M Urea 的 $NaHCO_3$-NaCl buffer 溶解重組蛋白後，利用鎳離子螯合膠體純化重組蛋白，收集沖提產物約 10 mL 放入透析袋並置於透析溶液中，由含 4 M Urea 的溶液開始，每四個小時換一次透析液，並且逐次降低 Urea 濃度（2 M、1 M、0.5 M、0 M Urea w/ $NaHCO_3$-NaCl buffer, 1mM DTT, pH 8.0），當換至不含 Urea 的溶液時，透析袋內卻開始產生白霧狀，離心後發現所有蛋白質皆產生沉澱，表示復性的效果十分不理想，蛋白質無法成為可溶性狀態，因此不適用於管柱製作。從此次逐步透析的方法進行修改，我們嘗試在 urea 低濃度的環境中添加膠體可耐受的 GdnHCl，試圖讓重組蛋白維持著非摺疊的狀態，裸露出可提供鍵結的一級胺結構。同樣將經由鎳離子螯合膠體純化的重組蛋白進行透析，並逐次降低 Urea 濃度（3 M、1.5 M、0.75 M、0 M Urea w/ $NaHCO_3$-NaCl buffer, 1mM DTT, pH 8.0），並在置換透析液為 0.75 M 及 0 M urea 的同時各添加 0.5 M GdnHCl，但重組蛋白質最後還是形成沉澱，無法應用於管柱製作。

後續實驗中，我們改良了接合配體的條件，將Coupling buffer改為MOPS-$CaCl_2$ buffer（0.1 M MOPS, 50 mM $CaCl_2$, pH 7.5），減少可能因帶電性相同而引發排斥現象(Frost et al., 1981)，同時參考Zhou et al. (2005) 與Zhao et al. (2006) 的方法，用6 M GdnHCl回溶包涵體後直接與含NHS活性位的膠體接合，然而此次測試並沒有成功接合重組蛋白與Affi-gel 10膠體。隨後改良此方法，用6 M GdnHCl溶解包涵體後再緩慢稀釋至1 M（此濃度的GdnHCl為Affi-gel 10使用手冊中提及可容忍的濃度），經過管柱製備的步驟後，終於順利接合蛋白質至膠體顆粒上，接合成功率達60.3%（表一），並且製作出可重複進行純化抗體的管柱（圖六）。

經過純化步驟後，IgY樣品純度明顯增加（圖七），並且有效提升抗體樣品的專一程度及效價表現，而具專一性的抗體在所有IgY中約含0.8%（圖六），參考目前文獻提及經免疫注射的雞隻所生產之蛋黃中，經純化後估算蛋黃中IgY約含有0.5～10%屬於專一性IgY (Schade, R. et al., 1994; Hansen et al., 1998; Li et al., 1998; Schade, R. et al., 2005; Paul et al., 2007; Qu et al., 2011)。本實驗原本注射雞隻所使用的抗原為分子結構完整的單株抗體，而純化IgY所用的重組蛋白並非完整的免疫球蛋白，僅有部分重鏈的固定端，約佔原免疫球蛋白結構的1/3，因此預期純化過程中會流失可辨識κ輕鏈、IgM重鏈C_H1與

IgM重鏈變異端的專一性IgY，而使得最終回收的專一性IgY比例偏低，若是以完整免疫球蛋白分子製作管柱，可預期專一性IgY回收將更為完整，所佔的比例可提升三倍左右。

經檢測純化前後的 IgY 效價，可發現純化後是純化前的 17.3 倍，此差距是因為未純化的 IgY 樣品中約含有 1/3 的其他蛋白質，又與抗原相應的 IgY 僅占微量所致。而由於純化後的 IgY 僅能辨識重鏈部分 C_H2、C_H3 domain，約佔整個免疫球蛋白分子的 1/3，未純化的 IgY 樣品則是可辨識完整的分子結構，因此可推測當固著在盤上的抗原改為 rIgM-HC 時，效價比將能再擴大倍數。

我們接著探討純化的專一性 IgY 對其他小鼠免疫球蛋白的辨識程度。免疫轉漬分析可見專一性 IgY 不會與兔、羊的免疫球蛋白發生交叉作用（cross-reactivity）（圖八 B），但會與小鼠各種 IgG 同型的重鏈結合（圖八 D），且不會與輕鏈產生反應；以 ELSIA 檢測（圖九）後可知專一性 IgY 對 IgG1、IgG2a、IgG2b 的辨識活性與 8H4 相比尚有 35%到 50%的相對活性，推測是專一性 IgY 經 rIgM-HC 純化後，仍為多株抗體，並非只針對抗原上單一表位（epitope），因此才會對小鼠的各種 IgG 同型重鏈有交叉作用發生。為能深入瞭解專一性 IgY 會辨識其他重練的原因，我們針對小鼠各型免疫球蛋白重鏈及輕鏈的胺基酸序列進行 BLAST 分析，結果發現 IgM 重鏈對其他重鏈與

輕鏈的相同度（identities）皆在 30％左右（表八），相似度（similarities）則接近 50％，但從胺基酸序列的比對結果（圖十一）來看，IgM 與 IgA 重鏈相同的部分較為分散，IgM 與 IgG 各亞型重鏈相同的部分則較為集中，使得 IgG 各亞型重鏈存在類似於 IgM 重鏈的抗原而能被專一性 IgY 辨識，因此推測胺基酸的排列是原對應 IgM 重鏈的專一性 IgY 能辨識 IgG 各亞型卻無法辨識 IgA 的主因。

表二、各種小鼠免疫球蛋白的重鏈與輕鏈胺基酸序列的 BLAST 結果。

Identities / Similarities	rIgM-HC	IgM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgA	κ	λ
rIgM-HC		99%	29%	28%	33%	36%	31%	32%
IgM	100%		31%	29%	30%	31%	32%	32%
IgG1	44%	47%		67%	67%	29%	30%	37%
IgG2a	46%	48%	79%		78%	30%	31%	34%
IgG2b	55%	49%	80%	87%		32%	32%	32%
IgA	53%	48%	48%	50%	51%		23%	34%
κ	50%	50%	49%	48%	52%	42%		42%
λ	47%	46%	56%	49%	51%	50%	63%	

序列來源：

IgM：GenBank Accession no. ABP35934.1

IgG1：GenBank Accession no. AAB59657.1

IgG2a：GenBank Accession no. CAA24178.1

IgG2b：GenBank Accession no. AAB59659.1

IgA：GenBank Accession no. AAB59662.1

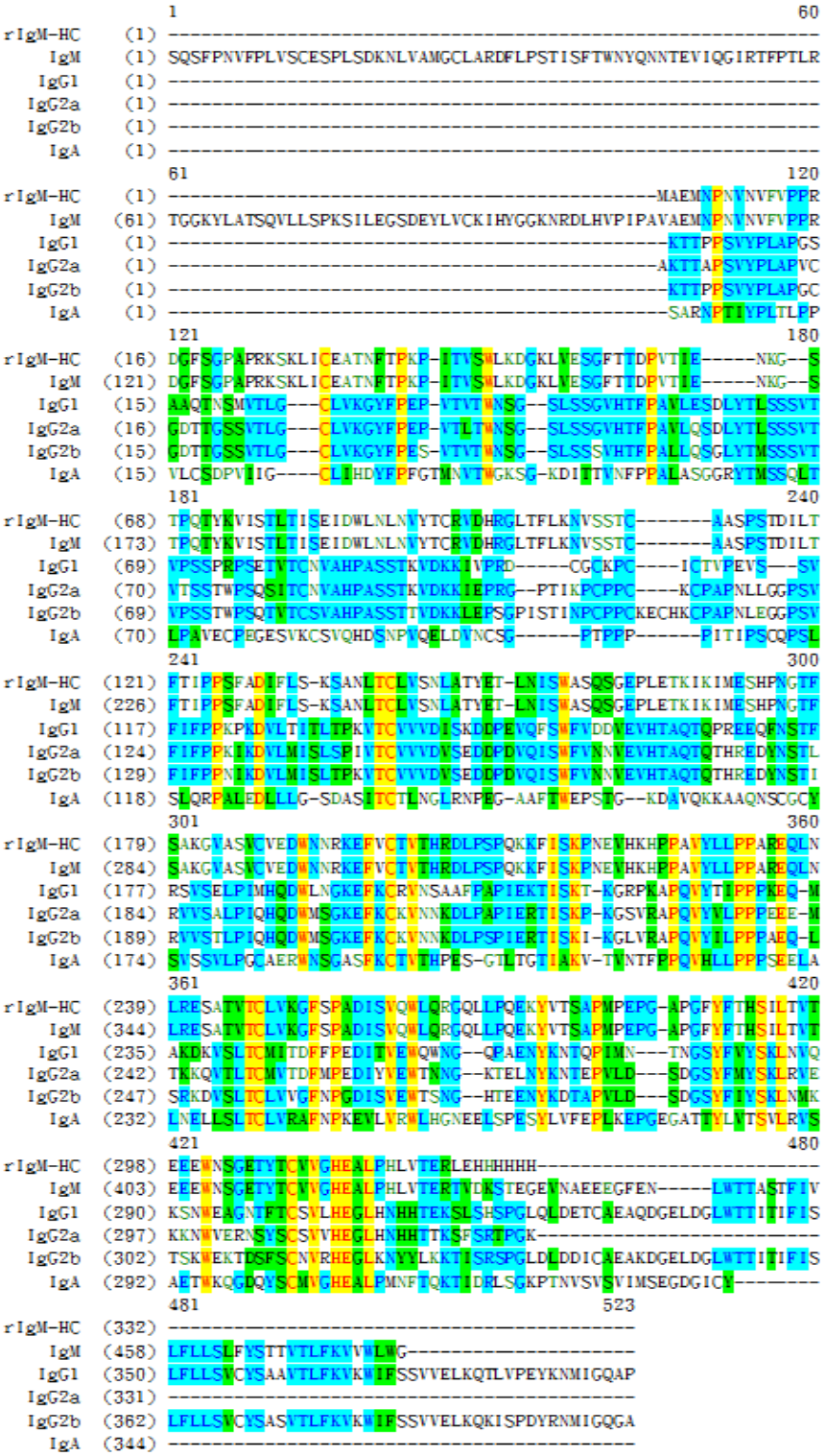
κ輕鏈：GenBank Accession no. BAC44884.1

λ輕鏈：GenBank Accession no. AAA39434.1

圖十一、rIgM-HC 與各型小鼠免疫球蛋白重鏈部分的胺基酸序列比對。

（經 Vector NTI 比對之結果）

（Non-similar：黑字白底；Conservative：藍字淺藍底；Block of similar：黑字綠底；Identical：紅字黃底；Weekly similar：綠字白底）



第六章 總結

以雞蛋生產 IgY 抗體具有多重的優點，但蛋黃中的高含量脂質易對 IgY 的純化及後續應用造成干擾。目前蛋黃 IgY 的萃取方法多步驟繁瑣、耗時冗長且成本較高，故發展出快速、有效且經濟的萃取方法將可使 IgY 抗體的製備更加便利，進而提升其使用的方便性與接受度。針對液態蛋黃的樣品，本研究開發出利用醋酸鈉溶液的粗萃取方法，搭配 40%硫酸銨飽和度的沉澱步驟，可於 2 小時內從一顆蛋黃中分離得到近 90 mg，且純度超過 80%的 IgY 樣品；針對冷凍蛋黃的樣品，我們則發展出氯仿萃取法搭配 50%硫酸銨飽和度的沉澱步驟，可在 2.5 小時內獲得回收率達 90%的 IgY 樣品。

在對雞隻進行免疫注射，生產 IgY 抗體的實驗部分，我們發現 300 μg 小鼠 IgM 抗原劑量的效果最佳，在經三次免疫注射後，有效雞蛋的收集時間可達 40 天以上；經本研究所開發的粗萃取步驟之後，再利用由重組抗原蛋白製備的吸附管柱進行純化，則可獲得幾近 100%純度且高效價的抗原專一性 IgY。

本研究所開發的兩種不同蛋黃樣品之 IgY 粗萃取方法，除了有效之外，更具簡單與便宜的優點，不僅可供學界的一般使用，亦可符合產業界的大規模生產目的；而找尋適當的抗原劑量來對雞隻進行免疫注射，並利用重組抗原蛋白的吸附管柱來純化專一性抗體的模式，更

可做為後續生產與純化 IgY 多株抗體的重要參考。

參考文獻

Akerstrom, B., Brodin, T., Reis, K., and Bjorck, L. (1985). Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. J Immunol *135*, 2589-2592.

Akita, E.M., Jang, C.B., Kitts, D.D., and Nakai, S. (1999). Evaluation of allergenicity of egg yolk immunoglobulin Y and other egg proteins by passive cutaneous anaphylaxis. Food Agr Immunol *11*, 191-201.

Akita, E.M., and Nakai, S. (1992). Immunoglobulins from Egg-Yolk - Isolation and Purification. J Food Sci *57*, 629-634.

Akita, E.M., and Nakai, S. (1993). Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. coli strain. J Immunol Methods *160*, 207-214.

Al-Haddad, S., Zhang, Z., Leygue, E., Snell, L., Huang, A., Niu, Y., Hiller-Hitchcock, T., Hole, K., Murphy, L.C., and Watson, P.H. (1999). Psoriasin (S100A7) expression and invasive breast cancer. Am J Pathol *155*, 2057-2066.

Anton, M. (2007). Composition and Structure of Hen Egg Yolk

Bioactive Egg Compounds. In, R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton, and R. Schade, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 1-6.

Arakawa, H., Hauschild, J., and Buerstedde, J.M. (2002). Requirement of the activation-induced deaminase (AID) gene for immunoglobulin gene conversion. Science *295*, 1301-1306.

Araujo, A.S., Lobato, Z.I., Chavez-Olortegui, C., and Velarde, D.T. (2010). Brazilian IgY-Bothrops antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. Toxicon *55*, 739-744.

Attallah, A.M., Abbas, A.T., Ismail, H., Abdel-Raouf, M., and El-Dosoky, I. (2009). Efficacy of passive immunization with IgY antibodies to a 58-kDa H. pylori antigen on severe gastritis in BALB/c mouse model. J Immunoassay Immunochem *30*, 359-377.

Awad, A.C., Bennink, M.R., and Smith, D.M. (1997). Composition and functional properties of cholesterol reduced egg yolk. Poult Sci *76*, 649-653.

Bang, B.G., and Bang, F.B. (1968). Localized lymphoid tissues and plasma cells in paraocular and paranasal organ systems in chickens. Am J Pathol *53*, 735-751.

Basu, A., Li, X., and Leong, S.S. (2011). Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes. Appl Microbiol Biotechnol *92*, 241-251.

Behn, I.I., Hommel, U., Oertel, M., and Hauschildt, S. (1996). Kinetics of IgY Formation after Immunisation of Hens with Different Protein Antigens. ALTEX *13*, 18-21.

Bizhanov, G., Jonauskiene, I., and Hau, J. (2004). A novel method, based on lithium sulfate precipitation for purification of chicken egg yolk immunoglobulin Y, applied to immunospecific antibodies against Sendai virus. Scand J Lab Anim Sci *31*, 121-130.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem *72*, 248-254.

Brambell, F.W. (1966). The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins. Lancet *2*, 1087-1093.

Bransteitter, R., Pham, P., Scharff, M.D., and Goodman, M.F. (2003). Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 4102-4107.

Braz, A., Minozzo, J., Abreu, J.C., Gubert, I.C., and Chavez-Olortegui, C. (1999). Development and evaluation of the neutralizing capacity of horse antivenom against the Brazilian spider Loxosceles intermedia. Toxicon *37*, 1323-1328.

Brunda, G., Sashidhar, R.B., and Sarin, R.K. (2006). Use of egg yolk antibody (IgY) as an immunoanalytical tool in the detection of Indian cobra (Naja naja naja) venom in biological samples of forensic origin. Toxicon *48*, 183-194.

Cai, Y.C., and Chen, J.X. (2009). [Chicken egg yolk immunoglobulin and its application in medicine]. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi *27*, 527-530.

Chalghoumi, R., Beckers, Y., Portetelle, D., and Thewis, A. (2009). Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. Biotechnol Agron Soc Environ *13*, 295-308.

Chalghoumi, R., Thewis, A., Portetelle, D., and Beckers, Y. (2008). Production of hen egg yolk immunoglobulins simultaneously directed against Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium in the same egg yolk. Poult Sci *87*, 32-40.

Chang, H.M., Lu, T.C., Chen, C.C., Tu, Y.Y., and Hwang, J.Y. (2000). Isolation of immunoglobulin from egg yolk by anionic polysaccharides. Journal of agricultural and food chemistry *48*, 995-999.

Chartrand, S.L., Litman, G.W., Lapointe, N., Good, R.A., and Frommel, D. (1971). The evolution of the immune response. XII. The immunoglobulins of the turtle. Molecular requirements for biologic activity of 5. J Immunol *107*, 1-11.

Chen, Y.-C., and Chang, H.-S. (2004). Analysis of the Components Responsible for the Gelation of Frozen Yolk and Studies on the Rheological Properties of Yolk

During Frozen Storage. Taiwanese Journal of Agricultural Chemistry and Food Science *42*, 23-28.

Chiarella, P. (2011). Production, novel assay development and clinical applications of monoclonal antibodies. Recent patents on anti-cancer drug discovery *6*, 258-267.

Cipolla, A., Cordeviola, J., Terzolo, H., Combessies, G., Bardon, J., Ramon, N., Martinez, A., Medina, D., Morsella, C., and Malena, R. (2001). Campylobacter fetus diagnosis: direct immunofluorescence comparing chicken IgY and rabbit IgG conjugates. ALTEX *18*, 165-170.

Cook, C.L., Pao, W., Firca, J.R., Anderson, B.E., and Fryer, J.P. (2001). Simple purification methods for an alphagalactose-specific antibody from chicken eggs. Journal of bioscience and bioengineering *91*, 305-310.

Cutting, J.A., and Roth, T.F. (1973). Changes in specific sequestration of protein during transport into the developing oocyte of the chicken. Biochim Biophys Acta *298*, 951-955.

da Silva, W.D., and Tambourgi, D.V. (2010). IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. Veterinary Immunology and Immunopathology *135*, 173-180.

Danielpour, D., and Roberts, A.B. (1995). Specific and sensitive quantitation of transforming growth factor beta 3 by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. J Immunol Methods *180*, 265-272.

Davalos-Pantoja, L., Ortega-Vinuesa, J.L., Bastos-Gonzalez, D., and Hidalgo-Alvarez, R. (2000). A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. J Biomat Sci-Polym E *11*, 657-673.

Di Lonardo, A.D., Marcante, M.L., Poggiali, F., Hamsoikova, E., and Venuti, A. (2001). Egg yolk antibodies against the E7 oncogenic protein of human papillomavirus type 16. Arch Virol *146*, 117-125.

Dickerson, S.K., Market, E., Besmer, E., and Papavasiliou, F.N. (2003). AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. J Exp Med *197*, 1291-1296.

Doth, M., Schade, R., Claas, S., and Matysiak, R. (1996). Assay Development of a Serum Marker for Myocardial Injury: Experiences with an Avian anti-Troponin I Antibody. ALTEX *13*, 45-50.

Fellah, J.S., Kerfourn, F., Wiles, M.V., Schwager, J., and Charlemagne, J. (1993). Phylogeny of immunoglobulin heavy chain isotypes: structure of the constant region of Ambystoma mexicanum upsilon chain deduced from cDNA sequence. Immunogenetics *38*, 311-317.

Fernandes, I., Takehara, H.A., and Mota, I. (1991). Isolation of IgGT from

hyperimmune horse anti-snake venom serum: its protective ability. Toxicon *29*, 1373-1379.

Franchimont, P., Reuter, A., and Gaspard, U. (1978). Ectopic production of human chorionic gonadotropin and its alpha- and beta-subunits. Curr Top Exp Endocrinol *3*, 201-216.

Freund, J. (1951). The effect of paraffin oil and mycobacteria on antibody formation and sensitization; a review. Am J Clin Pathol *21*, 645-656.

Frost, R.G., Monthony, J.F., Engelhorn, S.C., and Siebert, C.J. (1981). Covalent immobilization of proteins to N-hydroxysuccinimide ester derivatives of agarose. Effect of protein charge on immobilization. Biochim Biophys Acta *670*, 163-169.

Gandhi, S., Caplash, N., Sharma, P., and Raman Suri, C. (2009). Strip-based immunochromatographic assay using specific egg yolk antibodies for rapid detection of morphine in urine samples. Biosensors & bioelectronics *25*, 502-505.

Gasparyan, V.K. (2005). Hen egg immunoglobulin Y in colloidal gold agglutination assay: comparison with rabbit immunoglobulin G. J Clin Lab Anal *19*, 124-127.

Gassmann, M., Thommes, P., Weiser, T., and Hubscher, U. (1990). Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. FASEB J *4*, 2528-2532.

Gerl, M., Steinert, C., Quint, M., Schade, R., and Gunzler, V.V. (1996). Immunisation of Chickens with the Aminoterminal Propeptide of Bovine Procollagen Type III (Specificity of egg yolk antibodies and comparison with immunoassays using rabbit and mouse antibodies. ALTEX *13*, 51-56.

Glick, B., Chang, T.S., and Jaap, R.G. (1956). The Bursa of Fabricius and Antibody Production. Poultry Sci *35*, 224-225.

Grey, H.M. (1967). Duck immunoglobulins. I. Structural studies on a 5.7S and 7.8S gamma-globulin. J Immunol *98*, 811-819.

Hamilton, A.M., Lehuen, A., and Kearney, J.F. (1994). Immunofluorescence Analysis of B-1 Cell Ontogeny in the Mouse. International Immunology *6*, 355-361.

Hanly, W.C., Artwohl, J.E., and Bennett, B.T. (1995). Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. ILAR J *37*, 93-118.

Hansen, P., Scoble, J.A., Hanson, B., and Hoogenraad, N.J. (1998). Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. J Immunol Methods *215*, 1-7.

Hatta, H., Kim, M., and Yamamoto, T. (1990). A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". Agric Biol Chem *54*, 2531-2535.

Hatta, H., Tsuda, K., Akachi, S., Kim, M., and Yamamoto, T. (1993). Productivity and

some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. Biosci Biotechnol Biochem *57*, 450-454.

Heneine, L.G., Carvalho, A.D., Jr., Barbosa, C.F., and Aravjo dos Santos, M.R. (1998). Development of an ELISA to assess the potency of horse therapeutic polyvalent antibothropic antivenom. Toxicon *36*, 1363-1370.

Hernandez-Campos, F.J., Brito-De la Fuente, E., and Torrestiana-Sanchez, B. (2010). Purification of egg yolk immunoglobulin (IgY) by ultrafiltration: effect of pH, ionic strength, and membrane properties. Journal of agricultural and food chemistry *58*, 187-193.

Hoffmann, F., and Rinas, U. (2004). Stress induced by recombinant protein production in Escherichia coli. Adv Biochem Eng Biotechnol *89*, 73-92.

Horie, K., Horie, N., Abdou, A.M., Yang, J.O., Yun, S.S., Chun, H.N., Park, C.K., Kim, M., and Hatta, H. (2004). Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on Helicobacter pylori in humans. J Dairy Sci *87*, 4073-4079.

Jefferis, R. (2006). Antibodies. In Immunology (Canada: Mosby Elsevier), p. 60.

Klimentzou, P., Paravatou-Petsotas, M., Zikos, C., Beck, A., Skopeliti, M., Czarnecki, J., Tsitsilonis, O., Voelter, W., Livaniou, E., and Evangelatos, G.P. (2006). Development and immunochemical evaluation of antibodies Y for the poorly immunogenic polypeptide prothymosin alpha. Peptides *27*, 183-193.

Ko, K.Y., and Ahn, D.U. (2007). Preparation of immunoglobulin Y from egg yolk using ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. Poultry Sci *86*, 400-407.

Kohler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature *256*, 495-497.

Kovacs-Nolan, J., Phillips, M., and Mine, Y. (2005). Advances in the value of eggs and egg components for human health. Journal of agricultural and food chemistry *53*, 8421-8431.

Krichevsky, A., Armstrong, E.G., Schlatterer, J., Birken, S., O'Connor, J., Bikel, K., Silverberg, S., Lustbader, J.W., and Canfield, R.E. (1988). Preparation and characterization of antibodies to the urinary fragment of the human chorionic gonadotropin beta-subunit. Endocrinology *123*, 584-593.

Kronvall, G., Seal, U.S., Svensson, S., and Williams, R.C., Jr. (1974). Phylogenetic aspects of staphylococcal protein A-reactive serum globulins in birds and mammals. Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol *82*, 12-18.

Kunz, U.S., Pospischil, A., and Paccaud, M.F. (1991). Immunohistochemical detection of chlamydiae in formalin-fixed tissue sections: comparison of a monoclonal antibody with yolk derived antibodies (IgY). Zentralbl Veterinarmed B *38*,

292-298.
Laca, A., Paredes, B., and Diaz, M. (2010). A method of egg yolk fractionation. Characterization of fractions. Food Hydrocolloid *24*, 434-443.
Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature *227*, 680-685.
Larsson, A., Balow, R.M., Lindahl, T.L., and Forsberg, P.O. (1993). Chicken antibodies: taking advantage of evolution--a review. Poult Sci *72*, 1807-1812.
Larsson, A., Karlssonparra, A., and Sjoquist, J. (1991). Use of Chicken Antibodies in Enzyme Immunoassays to Avoid Interference by Rheumatoid Factors. Clinical Chemistry *37*, 411-414.
Larsson, A., Wejaker, P.E., Forsberg, P.O., and Lindahl, T. (1992). Chicken Antibodies - a Tool to Avoid Interference by Complement Activation in Elisa. Journal of Immunological Methods *156*, 79-83.
Leenaars, P.P.A.M., Hendriksen, C.F.M., de Leeuw, W.A., Carat, F., Delahaut, P., Fischer, R., Halder, M., Hanly, W.C., Hartinger, J., Hau, J.*, et al.* (1999). The production of polyclonal antibodies in laboratory animals - The report and recommendations of ECVAM Workshop 35. Atla-Altern Lab Anim *27*, 79-102.
Lei, B., and Wu, J. (2012). Purification of egg yolk phosvitin by anion exchange chromatography. J Chromatogr A *1223*, 41-46.
Leslie, G.A., and Clem, L.W. (1969). Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken. J Exp Med *130*, 1337-1352.
Leslie, G.A., and Clem, L.W. (1972). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. VI. 17S, 7.5S and 5.7S anti-DNP of the turtle, Pseudamys scripta. J Immunol *108*, 1656-1664.
Li-Chan, E.C.Y., and Kim, H.-O. (2007). Structure and Chemical Compositions of Eggs. In Egg Bioscience and Biotechnology (John Wiley & Sons, Inc.), pp. 1-95.
Li, X., Nakano, T., Sunwoo, H.H., Paek, B.H., Chae, H.S., and Sim, J.S. (1998). Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. Poult Sci *77*, 266-270.
Lillehoj, H.S., and Trout, J.M. (1993). Coccidia: a review of recent advances on immunity and vaccine development. Avian Pathol *22*, 3-31.
Lipman, N.S., Jackson, L.R., Trudel, L.J., and Weis-Garcia, F. (2005). Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information resources. Ilar Journal *46*, 258-268.
Magor, K.E., Higgins, D.A., Middleton, D.L., and Warr, G.W. (1994). One gene encodes the heavy chains for three different forms of IgY in the duck. J Immunol *153*, 5549-5555.
Magor, K.E., Warr, G.W., Middleton, D., Wilson, M.R., and Higgins, D.A. (1992).

Structural relationship between the two IgY of the duck, Anas platyrhynchos: molecular genetic evidence. J Immunol *149*, 2627-2633.

Male, D. (2006a). Introduction to the immune system. In Immunology (Canada: Mosby Elsevier), p. 9.

Male, D. (2006b). Introduction to the immune system. In Immunology (Canada: Mosby Elsevier), p. 8.

Male, D. (2006c). Mechanisms of innate immunity. In Immunology (Canada: Mosby Elsevier), pp. 127-128.

Maria, W.S., Cambuy, M.O., Costa, J.O., Velarde, D.T., and Chavez-Olortegui, C. (1998). Neutralizing potency of horse antibothropic antivenom. Correlation between in vivo and in vitro methods. Toxicon *36*, 1433-1439.

Marini, J.C. (2006). Cell cooperation in the antibody response. In Immunology (Canada: Mosby Elsevier), p. 172.

Maya Devi, C., Vasantha Bai, M., and Krishnan, L.K. (2002). Development of viper-venom antibodies in chicken egg yolk and assay of their antigen binding capacity. Toxicon *40*, 857-861.

Meenatchisundaram, S., Parameswari, G., Michael, A., and Ramalingam, S. (2008a). Neutralization of the pharmacological effects of Cobra and Krait venoms by chicken egg yolk antibodies. Toxicon *52*, 221-227.

Meenatchisundaram, S., Parameswari, G., Michael, A., and Ramalingam, S. (2008b). Studies on pharmacological effects of Russell's viper and Saw-scaled viper venom and its neutralization by chicken egg yolk antibodies. International Immunopharmacology *8*, 1067-1073.

Michael, A., Meenatchisundaram, S., Parameswari, G., Subbraj, T., Selvakumaran, R., and Ramalingam, S. (2010). Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies. Indian Journal of Science and Technology *3*, 468-474.

Moroz, C., De Vries, A., and Goldblum, N. (1966). Preparation of horse antiserum against Echis colorata (Gunther) venom and determination of its capacity to neutralize the toxic, afibrinogenemic and thrombocytopenic actions of Echis colorata and Echis carinata venoms. Ann Inst Pasteur (Paris) *110*, 276-282.

Mueller, A.P., Sato, K., and Glick, B. (1971). The chicken lacrimal gland, gland of Harder, caecal tonsil, and accessory spleens as sources of antibody-producing cells. Cell Immunol *2*, 140-152.

Muniz, E.G., Maria, W.S., Estevao-Costa, M.I., Buhrnheim, P., and Chavez-Olortegui, C. (2000). Neutralizing potency of horse antibothropic Brazilian antivenom against Bothrops snake venoms from the Amazonian rain forest. Toxicon *38*, 1859-1863.

Munoz, J.J., and Sewell, W.A. (1984). Effect of pertussigen on inflammation caused by Freund adjuvant. Infect Immun *44*, 637-641.

Newcombe, C., and Newcombe, A.R. (2007). Antibody production: Polyclonal-derived biotherapeutics. J Chromatogr B *848*, 2-7.

Nilsson, L., Osmark, P., Fernandez, C., Andersson, M., and Bergenstahl, B. (2006). Competitive adsorption of water soluble plasma proteins from egg yolk at the oil/water interface. Journal of agricultural and food chemistry *54*, 6881-6887.

Nomura, S., Suzuki, H., Masaoka, T., Kurabayashi, K., Ishii, H., Kitajima, M., Nomoto, K., and Hibi, T. (2005). Effect of dietary anti-urease immunoglobulin Y on Helicobacter pylori infection in Mongolian gerbils. Helicobacter *10*, 43-52.

Ntakarutimana, V., Demedts, P., van Sande, M., and Scharpe, S. (1992). A simple and economical strategy for downstream processing of specific antibodies to human transferrin from egg yolk. J Immunol Methods *153*, 133-140.

Ohnishi, T., Kakimoto, K., Hashida, S., Fujii, M., Hirono, S., Nishiyama, K., Amita, Y., Ishikawa, E., Tsubouchi, H., and Daikuhara, Y. (2000). Development of highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assays for hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF): determination of HGF/SF in serum and urine from normal human subjects. J Immunol Methods *244*, 163-173.

Ortiz-Bueno, A.M., Leon-Chavez, B.A., Ruiz-Tagle, A., Lozano-Zarain, P., Castro-Caballero, L., Achanzar, W.E., and Brambila, E. (2009). Production of metallothionein polyclonal antibodies using chickens as model. Appl Biochem Biotechnol *158*, 502-511.

Palaniyappan, A., Das, D., Kammila, S., Suresh, M.R., and Sunwoo, H.H. (2012). Diagnostics of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid antigen using chicken immunoglobulin Y. Poult Sci *91*, 636-642.

Patterson, R., Youngner, J.S., Weigle, W.O., and Dixon, F.J. (1962). Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. J Immunol *89*, 272-278.

Paul, K., Manjula, J., Deepa, E.P., Selvanayagam, Z.E., Ganesh, K.A., and Rao, P.V.S. (2007). Anti-Echis carinatus venom antibodies from chicken egg yolk: Isolation, purification and neutralization efficacy. Toxicon *50*, 893-900.

Pauly, D., Chacana, P.A., Calzado, E.G., Brembs, B., and Schade, R. (2011). IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. J Vis Exp.

Pepin-Covatta, S., Lutsch, C., Grandgeorge, M., Lang, J., and Scherrmann, J.M. (1996). Immunoreactivity and pharmacokinetics of horse anti-scorpion venom F(ab')2-scorpion venom interactions. Toxicol Appl Pharmacol *141*, 272-277.

Peter Lydyard, and Grossi, C.E. (2006). Cells, tissues and organs of the immune

system. In Immunology (Canada: Mosby Elsevier), p. 20.

Phan, J., Yamout, N., Schmidberger, J., Bottomley, S.P., and Buckle, A.M. (2011). Refolding your protein with a little help from REFOLD. Methods Mol Biol *752*, 45-57.

Platts-Mills, T.A.E. (2006). Immediate hypersensitivity. In Immunology (Canada: Mosby Elsevier), pp. 428-429.

Polson, A., Coetzer, T., Kruger, J., von Maltzahn, E., and van der Merwe, K.J. (1985). Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. Immunol Invest *14*, 323-327.

Polson, A., von Wechmar, M.B., and van Regenmortel, M.H. (1980). Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. Immunological communications *9*, 475-493.

Pour-Amir, M., Rasaee, M.J., Qujeq, Asadikaram, G., Moqhadam, M.F., and 53-57, I.J.A.A.I.s.o. (2000). A simple and economical procedure for the purification of immunoglobulin Y from egg yolk by T-gel chromatography. Iran J Allergy Asthma Immunol *1*, 53-57.

Prabhu, R.R., Ramamurty, N., and Mathiyalagan, A. (2010). Extraction and characterization of polyclonal egg yolk antibodies (IgY) in chicken against cobra (Naja naja) venom. Current Science *98*, 237-239.

Qu, J.X., Lin, Y.H., Ma, R.S., and Wang, H. (2011). Immunoaffinity purification of polyepitope proteins against Plasmodium falciparum with chicken IgY specific to their C-terminal epitope tag. Protein expression and purification *75*, 225-229.

Ratcliffe, M.J. (2006). Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. Developmental and comparative immunology *30*, 101-118.

Reynaud, C.A., Anquez, V., Grimal, H., and Weill, J.C. (1987). A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. Cell *48*, 379-388.

Reynaud, C.A., Anquez, V., and Weill, J.C. (1991). The chicken D locus and its contribution to the immunoglobulin heavy chain repertoire. Eur J Immunol *21*, 2661-2670.

Reynaud, C.A., Dahan, A., Anquez, V., and Weill, J.C. (1989). Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region. Cell *59*, 171-183.

Rodewald, R., and Abrahamson, D.R. (1982). Receptor-mediated transport of IgG across the intestinal epithelium of the neonatal rat. Ciba Found Symp, 209-232.

Rose, M.E., and Orlans, E. (1981). Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick. Developmental and comparative immunology *5*, 15-20.

Rose, M.E., Orlans, E., and Buttress, N. (1974). Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. Eur J Immunol *4*, 521-523.

Ruan, G.P., Ma, L., He, X.W., Meng, M.J., Zhu, Y., Zhou, M.Q., Hu, Z.M., and Wang, X.N. (2005). Efficient production, purification, and application of egg yolk antibodies against human HLA-A*0201 heavy chain and light chain (beta2m). Protein expression and purification *44*, 45-51.

Schade, R., Burger, W., Schoneberg, T., Schniering, A., Schwarzkopf, C., Hlinak, A., and Kobilke, H. (1994). [Avian egg yolk antibodies. The egg laying capacity of hens following immunisation with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies]. ALTEX *11*, 75-84.

Schade, R., Calzado, E.G., Sarmiento, R., Chacana, P.A., Porankiewicz-Asplund, J., and Terzolo, H.R. (2005). Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. Altern Lab Anim *33*, 129-154.

Schade, R., and Chacana, P.A. (2007). Livetin Fractions (IgY)

Bioactive Egg Compounds. In, R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton, and R. Schade, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 25-32.

Schade, R., and Hlinak, A. (1996). Egg Yolk Antibodies, State of the Art and Future Prospects. ALTEX *13*, 5-9.

Schade, R., Pfister, C., Halatsch, R., and Henklein, P. (1991). Polyclonal Igy Antibodies from Chicken Egg-Yolk - an Alternative to the Production of Mammalian Igg Type Antibodies in Rabbits. Atla-Altern Lab Anim *19*, 403-419.

Schmidt, P., Erhard, M.H., Schams, D., Hafner, A., Folger, S., and Losch, U. (1993). Chicken Egg Antibodies for Immunohistochemical Labeling of Growth-Hormone and Prolactin in Bovine Pituitary-Gland. J Histochem Cytochem *41*, 1441-1446.

Shin, J.H., Roe, I.H., and Kim, H.G. (2004). Production of anti-Helicobacter pylori urease-specific immunoglobulin in egg yolk using an antigenic epitope of H. pylori urease. J Med Microbiol *53*, 31-34.

Smith, I.D., and Perdue, H.S. (1966). Isolation and tentative identification of the carotenoid present in chicken skin and egg yolk. Poultry Sci *45*, 577–558.

Sunwoo, H.H., Lee, E.N., Menninen, K., Suresh, M.R., and Sim, J.S. (2002). Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on Escherichia coli O157 : H7. J Food Sci *67*, 1486-1494.

Svendsen Bollen, L., Crowley, A., Stodulski, G., and Hau, J. (1996). Antibody

production in rabbits and chickens immunized with human IgG. A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. J Immunol Methods *191*, 113-120.

Svendsen, L., Crowley, A., Ostergaard, L.H., Stodulski, G., and Hau, J. (1995). Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. Lab Anim Sci *45*, 89-93.

Tan, S.H., Mohamedali, A., Kapur, A., Lukjanenko, L., and Baker, M.S. (2012). A novel, cost-effective and efficient chicken egg IgY purification procedure. J Immunol Methods.

Tesar, D.B., Cheung, E.J., and Bjorkman, P.J. (2008). The chicken yolk sac IgY receptor, a mammalian mannose receptor family member, transcytoses IgY across polarized epithelial cells. Mol Biol Cell *19*, 1587-1593.

Thompson, C.B., and Neiman, P.E. (1987). Somatic diversification of the chicken immunoglobulin light chain gene is limited to the rearranged variable gene segment. Cell *48*, 369-378.

Tressler, R.L., and Roth, T.F. (1987). IgG receptors on the embryonic chick yolk sac. J Biol Chem *262*, 15406-15412.

Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., and Adley, C. (2010). An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. Biotechnology advances *28*, 232-254.

Verdoliva, A., Basile, G., and Fassina, G. (2000). Affinity purification of immunoglobulins from chicken egg yolk using a new synthetic ligand. J Chromatogr B Biomed Sci Appl *749*, 233-242.

Villaverde, A., and Carrio, M.M. (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. Biotechnol Lett *25*, 1385-1395.

Wakamatu, T., Sato, Y., and Saito, Y. (1983). On Sodium Chloride Action in the Gelation Process of Low Density Lipoprotein (LDL) from Hen Egg Yolk. J Food Sci *48*, 507-512.

Warr, G.W., Magor, K.E., and Higgins, D.A. (1995). IgY: clues to the origins of modern antibodies. Immunol Today *16*, 392-398.

Wight, P.A., Burns, R.B., Rothwell, B., and Mackenzie, G.M. (1971). The Harderian gland of the domestic fowl. I. Histology, with reference to the genesis of plasma cells and Russell bodies. J Anat *110*, 307-315.

Wild, A.E. (1975). Role of the cell surface in selection during transport of proteins from mother to foetus and newly born. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci *271*, 395-410.

Woolley, J.A., and Landon, J. (1995). Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. J Immunol Methods *178*, 253-265.

Wu, C.J., Wang, H., Chan, Y.L., and Li, T.L. (2011). Passive immune-protection of small abalone against Vibrio alginolyticus infection by anti-Vibrio IgY-encapsulated feed. Fish Shellfish Immunol.

Xu, Y., Li, X., Jin, L., Zhen, Y., Lu, Y., Li, S., You, J., and Wang, L. (2011). Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. Biotechnology advances *29*, 860-868.

Xu, Y., Lin, H., Sui, J., and Cao, L. (2012). Effects of specific egg yolk antibody (IgY) on the quality and shelf life of refrigerated Paralichthys olivaceus. J Sci Food Agric *92*, 1267-1272.

Yamamura, J., Adachi, T., Aoki, N., Nakajima, H., Nakamura, R., and Matsuda, T. (1995). Precursor-Product Relationship between Chicken Vitellogenin and the Yolk Proteins - the 40-Kda Yolk Plasma Glycoprotein Is Derived from the C-Terminal Cysteine-Rich Domain of Vitellogenin-Ii. Bba-Gen Subjects *1244*, 384-394.

Yang, J., and Yi, Q. (2011). Therapeutic monoclonal antibodies for multiple myeloma: an update and future perspectives. American journal of blood research *1*, 22-33.

Zhao, Q.G., Zhou, Y., Zhu, H.Q., Lu, B.S., and Huang, P.T. (2006). Generation of mouse FANCL antibody and analysis of FANCL protein expression profile in mouse tissues. Yi Chuan Xue Bao *33*, 49-55.

Zhen, Y.H., Jin, L.J., Guo, J., Li, X.Y., Li, Z., Fang, R., and Xu, Y.P. (2008). Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing Staphylococcus aureus. J Appl Microbiol *105*, 1529-1535.

Zhou, Y., Zhao, Q., Bishop, C.E., Huang, P., and Lu, B. (2005). Identification and characterization of a novel testicular germ cell-specific gene Ggnbp1. Mol Reprod Dev *70*, 301-307.

Zimmerman, B., Shalatin, N., and Grey, H.M. (1971). Structural studies on the duck 5.7S and 7.8S immunoglobulins. Biochemistry *10*, 482-488.

附錄

附錄一、縮寫對照表

縮寫	全名
AID	Activation induced cytidine deaminase
AmS	Ammonium sulfate
AP	Alkaline phosphatase
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate
BSA	Bovine serum albumin
Cam	Chloramphenicol
CBB	Coomassie Brilliant Blue
cDNA	Complementary DNA
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylenediamine tetra-acetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtBr	Ethidium bromide
FCA	Freund’s complete adjuvant
FIA	Freund’s incomplete adjuvant
GAR-AP	Goat anti-rabbit antibody alkaline phosphatase conjugate
GdnHCl	Guanidium hydrochloride
hCG	human chorionic gonadotropin
HDL	High density lipoprotein
HRP	Horseradish peroxidase
IgA	Immunoglobulin A
IgD	Immunoglobulin D
IgE	Immunoglobulin E
IgG	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M
IgM-HC	IgM heavy chain constant region fragment
IgY	Immunoglobulin Y
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactoside
Kan	Kanamycin
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria-bertani

LDL	Low density lipoprotein
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger RNA
MW	Molecular weight
NBT	Nitro blue tetrazolium
NHS	N-hydroxysuccinimide esters
FcRn	Neonatal Fc receptor
PBS	Phosphate-buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylene glycols
pI	Isoelectric point
PLA2R	mammalian phospholipase A2 receptor
pNPP	p-Nitrophenyl phosphate
RNA	Ribonucleic acid
rIgM-HC	recombinant IgM heavy chain constant region fragment
rKC	recombinant kappa light chain constant region fragment
rpm	Revolutions per minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TAE buffer	Tris-acetate-EDTA buffer
UV	Ultraviolet

附錄二、中英對照表

英文	中文
Adaptive immunity	適應性免疫
Alkaline phosphatase	鹼性磷酸酶
Ammonium sulfate	硫酸銨
Antibody dependent cellular cytotoxicity	抗體依賴型吞噬細胞毒殺作用
Antigen-adsorption chromatography	抗原吸附層析法
Booster	激活注射
Bovine serum albumin	牛血清蛋白
Bursa of Fabricius	法氏囊
Campylobacter jejuni	空腸彎曲桿菌
Carotene	胡蘿蔔素
Carotenoid	類胡蘿蔔素
Cellular immunity	細胞免疫
Competent cell	勝任細胞
Complement fixation	補體固定作用
Complement system	補體系統
Conserved protein	保守性蛋白質
Constant region	固定端

Coronavirus	冠狀病毒
Cross-reactivity	交叉作用
Cytosine	胞嘧啶
DEAE chromatography	離子交換樹脂
DNA helicase	DNA 解旋酶
Gel filtration	凝膠過濾法
Gallus gallus	雞
Gallus gallus domesticus	萊亨雞
Electric point	等電點
Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素連結免疫吸附分析法
Epitope	表位
Escherichia coli	大腸桿菌
Freund’s complete adjuvant	佛氏完全佐劑
Freund’s incomplete adjuvant	佛氏不完全佐劑
Gene conversion	基因轉換
Glycoprotein	醣蛋白
Granule protein	顆粒蛋白
Harderian gland	哈氏腺
Helicobacter pyroli	幽門螺旋桿菌

High density lipoprotein	高密度脂蛋白
Histamine	組織胺
Horseradish peroxidase	山葵過氧化酶
Human chorionic gonadotropin	人類絨毛膜性腺激素
Humoral immunity	體液免疫
Hybridoma cell	融合瘤細胞
Hyperimmunized	高度免疫
Identity	相同度
Immunoglobulin	免疫球蛋白
Innate immunity	先天性免疫
Inclusion body	包涵體
Isotype	同型
Ligand	配體
Ligation	嵌合反應
Low density lipoprotein	低密度脂蛋白
Major histocompatibility complex	主要組織相容複合物
Memory B cell	記憶 B 細胞
Monoclonal antibody	單株抗體
Mycobacterium tuberculosis	結核桿菌

Nitrocellulose membrane	硝化纖維膜
Opsonization	調理作用
Pepsin	胃蛋白酶
Phagocytosis	吞噬作用
Phosvitin	蛋黃磷醣蛋白
Phylogenetic distance	親緣差距
Plasma cell	漿細胞
Plasma protein	漿蛋白
Polyclonal antibody	多株抗體
Polyethylene glycol	聚乙二醇
Porphyromonas gingivalis	牙周炎致病菌
Pseudogene	偽基因
Recombination signal sequences	重組訊號序列
Refolding	復性
Rotavirus	輪狀病毒
Salmonella enterica	沙門氏菌
Similarity	相似度
Standard deviation	標準差
Streptococcus mutans	變形鏈球菌

T cytotoxic cells	T 毒殺細胞
T helper cells	T 輔助細胞
Thiophilic chromatography	親硫吸附層析法
Truncated IgY	截短形 IgY
T suppressor cells	T 抑制細胞
Urease	尿素酶
Uridine	尿嘧啶
Variable region	變異端
Vector	載體
Western blotting (Immunoblotting)	免疫轉漬實驗
Xanthophyll	葉黃素

附錄三、膠體電泳分析之溶液配方

◎ 12％ Poly−acrylamide gel

	4％ Stacking gel	12％ Separating gel
Tris-Cl	125 mM（pH6.8）	375 mM（pH8.8）
SDS（w/v）	0.1％	0.1％
Acrylamide（w/v）	4％	12％
Ammonium persulfate （APS）（w/v）	0.1％	0.1％
N,N,N,‘N’-tetramethylethylene-diamine（TEMED）（v/v）	0.05％	0.05％

◎ SDS running buffer

Tris	25 mM
Glycine	192 mM
SDS（w/v）	0.1％

◎ **SDS sample buffer**

Tris-Cl, pH6.8	62.5 mM
SDS（w/v）	2%
2-mercaptoethanol（v/v）	5%
Glycerol（v/v）	10%
Bromophenol blue（w/v）	0.05%

- 無染劑的 SDS sample buffer 則無添加 Bromophenol blue

◎ **Coomassie Blue 染液**

Coomassie Brilliant Blue R-250（w/v）	0.25%
Methanol（v/v）	50%
Acetic acid（v/v）	10%

◎ **褪染液**

	一級褪染液	二級褪染液
Methanol（v/v）	50%	5%
Acetic acid（v/v）	10%	7%

附錄四、免液化學實驗之試劑配方

1. 酵素連結免疫吸附法

◎ 0.2 M Borate saline（pH 8.5）

boric acid	200 mM
sodium borate	5 mM
NaCl	75 mM

◎ Wash buffer（pH 8.0）

Tris-Cl	10 mM
Tween-20（v/v）	0.05%
NaN_3（w/v）	0.02%

◎ ELISA Diluent（in PBS）

BSA（w/v）	1%
Tween-20（v/v）	0.05%
NaN_3（w/v）	0.02%

◎ ELISA substrate buffer（pH 9.6）

diethanolamine ($C_4H_{11}NO_2$) （v/v）	9.6%
$MgCl_2$	0.5 mM

◎ **1.6 μM pNPP**：5 mg p-Nitrophenyl phosphate（Sigma，S0942）

in 8.3 mL ELISA substrate buffer

2. 免疫轉漬實驗

◎ Electroblotting buffer

Glycine	192 mM
Tris base	25 mM
Methanol（v/v）	20%

◎ Western substrate buffer（pH 9.5）

Tris-HCl	100 mM
NaCl	100 mM
$MgCl_2$	5 mM

◎ AP 受質：166 μg/mL BCIP, 333 μg/mL NBT in Western substrate buffer

附錄五、微生物培養基配方

◎ **LB medium for bacteria**

1L	
Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
Agar (for solid medium)	15 g

- Adjust pH to 7.0 with 3 N NaOH
- Autoclaved at 121℃ for 15 min.

附錄六、rgM-HC的核苷酸序列

（GenBank Accession no. ABP35934.1；灰色部分原為pET-24a所有。）

```
   1  ATGGCAGAGA TGAACCCCAA TGTAAATGTG TTCGTCCCAC CACGGGATGG CTTCTCTGGC
  61  CCTGCACCAC GCAAGTCTAA ACTCATCTGC GAGGCCACGA ACTTCACTCC AAAACCGATC
 121  ACAGTATCCT GGCTAAAGGA TGGGAAGCTC GTGGAATCTG GCTTCACCAC AGATCCGGTG
 181  ACCATCGAGA ACAAAGGATC CACACCCCAA ACCTACAAGG TCATAAGCAC ACTTACCATC
 241  TCTGAAATCG ACTGGCTGAA CCTGAATGTG TACACCTGCC GTGTGGATCA CAGGGGTCTC
 301  ACCTTCTTGA AGAACGTGTC CTCCACATGT GCTGCCAGTC CCTCCACAGA CATCCTAACC
 361  TTCACCATCC CCCCCTCCTT TGCCGACATC TTCCTCAGCA AGTCCGCTAA CCTGACCTGT
 421  CTGGTCTCAA ACCTGGCAAC CTATGAAACC CTGAATATCT CCTGGGCTTC TCAAAGTGGT
 481  GAACCACTGG AAACCAAAAT TAAAATCATG GAAAGCCATC CCAATGGCAC CTTCAGTGCT
 541  AAGGGTGTGG CTAGTGTTTG TGTGGAAGAC TGGAATAACA GGAAGGAATT TGTGTGTACT
 601  GTGACTCACA GGGATCTGCC TTCACCACAG AAGAAATTCA TCTCAAAACC CAATGAGGTG
 661  CACAAACATC CACCTGCTGT GTACCTGCTG CCACCAGCTC GTGAGCAACT GAACCTGAGG
 721  GAGTCAGCCA CAGTCACCTG CCTGGTGAAG GGCTTCTCTC CTGCAGACAT CAGTGTGCAG
 781  TGGCTTCAGA GAGGGCAACT CTTGCCCCAA GAGAAGTATG TGACCAGTGC CCCGATGCCA
 841  GAGCCTGGGG CCCCAGGCTT CTACTTTACC CACAGCATCC TGACTGTGAC AGAGGAGGAA
 901  TGGAACTCCG GAGAGACCTA TACCTGTGTT GTAGGCCACG AGGCCCTGCC ACACCTGGTG
 961  ACCGAGAGGC TCGAGCACCA CCACCACCAC CACTGA
```