

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

對大腸桿菌與沙門氏桿菌特異性雞卵黃抗體 (IgY) 與抗原
之體外作用(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-301-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學食品科技研究所

計畫主持人：張鴻民

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 1 月 6 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

對大腸桿菌與沙門氏桿菌特異性雞卵黃抗體（IgY）與抗
原之體外作用

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91 - 2313 - B - 002 - 301

執行期間：91年08月31日至92年7月31日

計畫主持人：張鴻民

計畫參與人員：張佳惠 林鴻琦

執行單位：台灣大學食品科技研究所

中華民國 92 年 12 月 25 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

對大腸桿菌與沙門氏桿菌特異性雞卵黃抗體 (IgY) 與抗原之體外作用

計畫編號：NSC 91-2313-B-002-301

執行期限：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：張鴻民

執行機構及單位名稱：台灣大學食品科技研究所

計畫參與人員：張佳惠 林鴻琦

執行機構及單位名稱：台灣大學食品科技研究所

中文摘要

由於抗體在動物體內免疫反應扮演重要之角色，對外來微生物抗原具有摧毀之效用，但抗體之體外作用研究者少。本研究以大腸桿菌及沙門氏菌免疫兔子及來亨雞，進行抗體與抗原間之結合性之探討發現，當粗 IgY 之濃度為 1.25-5 mg/mL 時仍可與沙門氏菌及大腸桿菌形成可見之沈澱。而對於特定抗體抑制其特定抗原微生物生長及毒性產生方面，當添加抗體的濃度為 10 及 20 mg/mL 時，對生長指數期及生長延滯期之大腸桿菌及沙門氏菌之生長皆無影響，且不論以免疫來亨雞所產生的粗 IgY 或是免疫兔子所產生的 IgG 經市售分離 IgG 親和式層析管柱分離之精緻 IgG 的拮抗微生物能力皆不足，顯示抗體於體外的拮抗能力並不顯著。

關鍵詞：蛋黃、IgG、IgY、*E. coli*、*S. typhimurium*

Abstract:

Antibody plays important role in immunity in vivo against foreign microorganisms; however, their exact roles in vitro are still rare. Hens were immunized

with *E. coli* and salmonella to obtain antibodies (IgY) to react with the corresponding antigen and found that crude IgY at a level of 1.25-5 mg/mL formed precipitation with the corresponding *E. coli* or Salmonella. In inhibition on corresponding microorganism growth, crude IgY at a level of 10-20 mg/mL was observed to be ineffective in suppressing the *E. coli* or Salmonella in long phase or in static phase. Besides, antibodies purified with commercial antibody-bound immunoaffinity columns showed insignificant anti-microorganism activity, revealing the weak reaction of antibody with corresponding antigen *in vivo*.

keywords : Yolk, IgG, IgY, *Escherichia. coli*, *Salmonella typhimurium*

計畫緣由與目的

食品中毒事件之發生，歷年來在台灣及世界各地層出不窮，以台灣為例，1999 年總共發生 150 件食品中毒之案件，中毒者高達 3112 人，甚至造成一人死亡，其中絕大部份皆因食物中污染病原菌或其所產生之毒素所引起的（衛生

署, 2002), 因此食品中毒事件是食品衛生安全很值得注意的問題, 一般食品業界為避免微生物污染問題所處理的方法有加熱殺菌法或是添加食品添加物來防止微生物之腐敗, 但加熱殺菌法會破壞食品原本之質地, 且有些食品成分會對熱敏感, 不適用加熱殺菌法, 且在消費者意識抬頭的今日, 食品要求為自然、健康, 標榜無任何添加物的存在, 在食品中添加化學添加物, 漸為消費者所排斥, 但有些食品不耐保存, 需經適當處理才具商業價值。故若可由食品中的雞蛋中生產可拮抗污染微生物的抗體, 即可減少或避免化學添加物的使用, 降低食品微生物污染的可能性, 並可延長食品的保存期限。而大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 及沙門氏桿菌 (*Salmonella spp.*) 普遍存在於環境中, 其天然棲息地是人畜之腸內, 容易在加工食品處理過程中污染食品, 因此本實驗以此食品微生物當作抗體拮抗微生物之指標。

結果與討論

本研究以大腸桿菌與沙門氏菌免疫處理兔子及來亨雞, 探討不同精製程度之特殊抗原之抗體拮抗微生物之活性。

一、抗體與抗原結合之探討

抗體與抗原間具有專一性之結合, 且兩者在水溶液內會因交互作用而有結晶格 (lattice) 之產生並漸漸形成可見之沈澱物 (precipitate)。當粗 IgY 之濃度為 1.25-5 mg/ mL 時仍可與沙門氏菌及大腸桿菌形成可見之沈澱, 效果雖不顯著, 但此結果與 Shimizu 等 (1988) 相似。

二、抗體拮抗微生物活性之探討

(一) 抑制環之檢測

先將活化後之待測微生物均勻塗佈於 TSA 上, 後再將不同濃度之待測微生物特異性之抗體樣品濾紙片置於培養基上, 置於 37 °C 下培養 24 小時

觀察抑制環之形成, 發現抑制環的形成效果並不顯著, 故直接採用微生物與抗體樣品直接培養, 以觀察抗體拮抗微生物之活性。

(二) 探討抗特定抗原之抗體對不同生長期之微生物生長曲線之影響

不同生長期的微生物對外界環境的抗性即不同, 因此本研究探討來亨雞中抗微生物抗體對其特定微生物之不同生長期 (生長指數期、生長延滯期) 之影響。不同生長期的微生物對外界環境的抗性即不同, 因此本研究探討不同來源之微生物抗體對其特定微生物之不同生長期 (生長指數期、生長延滯期) 之影響。首先將待測微生物分別培養在 2 管 10 mL 之 TSB 試管中, 使其分別達到生長期 (exponential phase, $A_{600nm} = 1$) 及生長遲滯期 (stationary phase, 培養 48 小時), 再以離心方式收集菌體 (3000 $\times g$, 4 min), 並以 4 mL 之無菌水沖洗, 之後再將收集之菌體重新懸浮於 10 mL 之 TSB, 再將此菌體懸浮液平均分成兩管: 分成控制組及試驗組 (添加不同來源及不同精緻程度之抗體, 抗體濃度為 10 或 20 mg/mL)。結果發現, 雖然抗體可以與特定微生物形成可見之沈澱, 但微生物之生長並未受到限制, 故其抑制率並不佳, 不論是生長對數期或是生長延滯期的微生物, 皆可觀察到此現象 (圖一、圖二), 顯示抗體僅能與其特定抗原微生物產生沈澱, 但無法有效抑制其生長。而不同來源 (IgG 及 IgY) 及精緻程度不同之抗體 (使用市售分離 IgG 親和式層析管柱分離之 IgG) 亦是觀察到此現象 (圖三)。Shimizu 等 (1988) 研究顯

示抗 *E. coli* 的 IgY 除了可以與 *E. coli* 形成可見沉澱外，亦可因菌體之聚合而使之無法生長，此與本研究之結果並不相似，經研究其抗體純化步驟發現，由於透析過程中有添加 NaN_3 以避免透析過程中抗體之敗壞，但其最後過程並未去除此毒性物質成分，故若添加至實驗過程中可有效抑制微生物生長，而本研究若亦採取此方法而未去除 NaN_3 成分，亦可得到與之相似之結果，抑菌效果明顯（圖四）。故推測其 IgY 抗菌的活性可能來自 NaN_3 。

（三）探討特定抗原對微生物分泌毒素之影響

為探討抗體是否具有抑制細菌毒素產生之能力，故本研究使用金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 當作抗原免疫來亨雞以取得特定之抗體，並以市售 kit 檢測抗體的添加對金黃色葡萄球菌產生細菌毒素 (enterotoxin A) 之影響。結果顯示，抗體可以聚合菌體，但對金黃色葡萄球菌產生細菌毒素的能力並沒有辦法有效抑制。

計畫成果自評

許多研究指出，口服抗體（被動免疫）可有效抑制胃腸中微生物，具有治療及預防疾病之功效，一般推測其抗菌之能力可能來自抗體將菌體聚合，使菌體無法有效的吸附至腸黏膜而侵入人體，而本研究之結果指出，在體外試驗時，抗體的添加有助於菌體的聚合，但對於抑制菌體的生長效果並不顯著，故推測口服抗體的功用並不是僅單純來自於抑制菌體的生長，而是限制菌體的活動力。

行政院衛生署，2002。台灣地區食品中毒事件與病因物質統計表（民國 89 年 1 月-12 月）。行政院衛生署。台北。

李陽春，1999。以幽門螺旋桿菌(*Helicobacter pylori*)之尿素 (23406a) 免疫處理雞所產雞蛋蛋黃微膠囊化後抗體的安定性研究。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。

杜豔櫻，2000。以雞蛋黃免疫球蛋白-免疫親和式層析法對牛乳鐵蛋白及豬血丙型球蛋白之純化。國立台灣大學食品科技研究所博士論文。

陳玉堂，1996。以 *Streptococcus mutans* 免疫處理雞卵所產生抗體之性質及其安定性之研究。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。

陳昭誠，1998。牛乳免疫球蛋白 G 安定性之研究。國立台灣大學食品科技研究所博士論文。

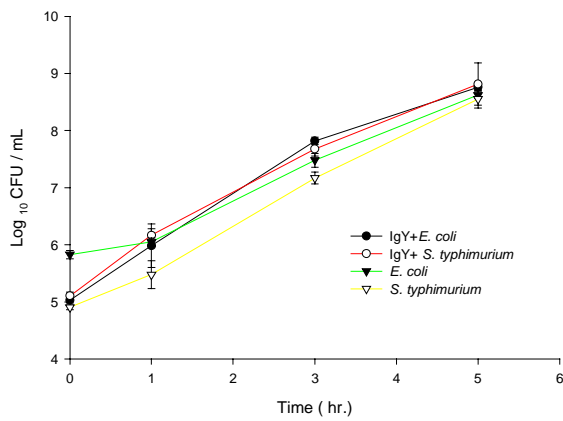
歐陽瑞芬，1997。以 *Streptococcus mutans* (c) 免疫處理雞所產雞蛋蛋黃中抗體之安定性之研究。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。

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

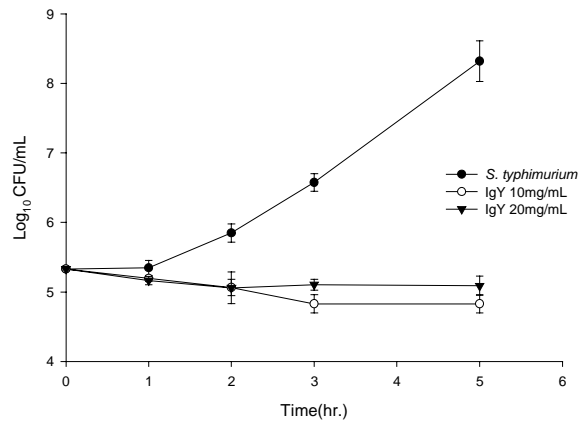
Kronvall G. 1973. A surface component in group A, C and G streptococci with noimmune reactivity for immunoglobulin G. *J Immunol* 111:1401-1407.

Shimizu M, Fitzsimmons RC, Nakai S. 1988. Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *J Food Sci* 53(5): 1360-1366.

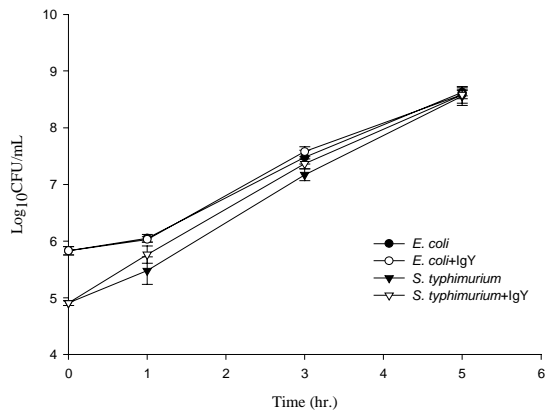
參考文獻



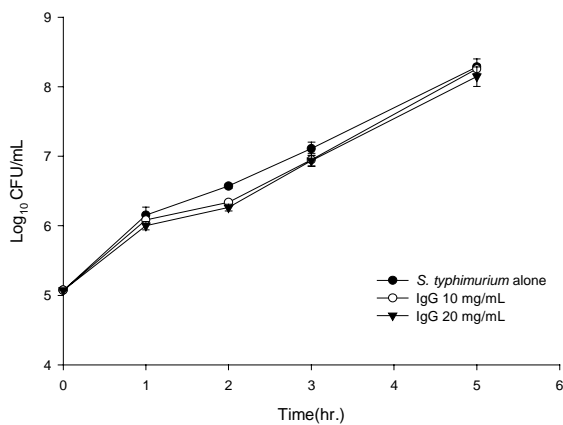
圖一、抗特定抗原之 IgY (10mg/mL) 對生長指數期之微生物生長之影響。



圖四、抗特定抗原之 IgY (10 及 20mg/mL) 若於透析時未去除 0.1%NaN₃ 對 *S. typhimurium* 生長之影響



圖二、抗特定抗原之 IgY (10mg/mL) 對生長延滯期之微生物生長之影響。



圖三、以市售分離 IgG 親和式層析管柱分離之 IgG 對 *S. typhimurium* 生長之影響。

