

生鮮乳中免疫球蛋白(IgG)含量的比較

劉美瑛 蔣思澈* 徐成金

中山醫學院營養科學研究所 中山醫學院醫技學系*

摘 要

本篇研究之目的在利用傳統的三明治型酵素連結免疫吸附分析法(Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay)分析及觀察在生、鮮乳中免疫球蛋白濃度及量上的差異性,以探討此蛋白的濃度可否作為牛奶品質的一個指標。

在之前的預實驗,利用SDS-polyacrylamide gel electrophoresis電泳分析經不同濃度硫酸銨劃分所得到的生、鮮乳蛋白質成份的差異,發現其中的免疫球蛋白G(immunoglobulin G)的色帶顏色差異相當大。由東海大學牛乳加工廠所取得的生乳經單離純化得到均一純度免疫球蛋白,由兔子免疫後所製得具有單一特異性(mono-specific)的抗血清,應用三明治型酵素連結免疫吸附分析法追蹤生、乳鮮中免疫球蛋白含量的變化。

生乳中的濃度為 $140.73 \pm 16.99 \mu\text{g/ml}$,在市售鮮乳濃度的變化在 $0.16 \pm 0.017 \mu\text{g/ml}$ 至 $0.28 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$,此現象可能是因為牛奶會隨著加熱、加工過程所造成的差異。

前 言

關於鮮乳檢出還原乳的方法,已有許多報告,例如:利用蛋白質還原物質(protein-reducing substance)與鐵氰化鉀(potassium ferricyanide)^(1,2)、刃天青(rezazurin)^(3,4)、磷酸鉬(phosphomolybdic acid)^(5,6)反應再以比色法檢出,亦有以乳清變性氮及總鈣量測定⁽⁷⁾。本實驗室曾在先前一項預實驗中,以不同硫酸銨(ammonium sulfate)濃度將生乳與市售鮮乳中的蛋白質成份加以劃分後,再進行一連串的電泳分析及觀察其蛋白質組成上的差異性,以期能找出一個可作為鮮乳純度指標的蛋白質成分。在此預實驗的結果中發現生、鮮乳中的免疫球蛋白G(immunoglobulin G)的色帶濃淡差異相當大,因此在本實驗中進一步將牛乳中的免疫球蛋白G經由蛋白質純化過程單離,並製得一具有單一專一性(mono-specific)的兔子抗牛血清免疫球蛋白抗體,再以傳統的三明治型酵素連結免疫吸附分析法(Sandwich enzyme-linked immunosorbent ass-

ay)來分析與比較在生、鮮乳中的免疫球蛋白含量的變化。

材料與方法

一、牛乳之來源

生乳取自於東海大學牛乳加工廠,市售鮮乳及奶粉購自於超級市場。在進行三明治型酵素連結免疫吸附法時,是將生乳稀釋2000倍,鮮乳稀釋10倍後測試,在總蛋白量分析時一律50倍稀釋後分析。

二、免疫球蛋白的純化

(一)將生乳一倍稀釋,加入25%醋酸,於70°C水浴20分鐘,再於4°C下以3000rpm離心10分鐘(Himac CR15D, Hitachi),除去牛乳中佔大部分的酪蛋白(casein),取上清加入結晶型硫酸銨使終濃度達50%,靜置15分鐘後,經離心取沈澱劃分,溶解後以0.1M Tris-HCl, pH7.4透析數次。

(二)將透析後的蛋白液,通過Sephadex G-200管

柱(90cm/2.2cm; Phamacia), 首先以 50mM Tris-HCl 緩衝液沖洗管柱, 再以含 0.1M 食鹽濃度緩衝液沖洗, 同時以自動收集器(SF-160Z, Toyo)收集, 以分光光度計 (Model 7800 UV/VIS Spectrophotometer, Jasco) 在 280nm 下測吸光, 並利用 Laemmli 所發展的方法, 在未還原的狀態下進行 12% SDS-PAGE (Mini-protein II, Bio-Rad) 電泳分析⁽⁸⁾, 以 0.1% Coomassie Blue (Merck) 將電泳膠片染色, 脫色後觀察找出帶有免疫球蛋白 G 的分液, 同時以低分子量的標準液 (low molecular weight standard; Bio-Rad) 做為對照。

(三) 將帶有免疫球蛋白 G 的分液經凍乾手續後, 利用離子交換樹脂層析法, 通過 DEAE-Sephacel 管柱 (38cm/1.5cm), 以 50mM Tris-HCl 緩衝液沖洗管柱, 同時利用自動收集器收集。收集第一個吸收峰 (不會滯留於管柱的劃分), 以分光光度計在 280nm 下測量吸光, 並進行電泳分析。

(四) 經由上述步驟確認後, 將劃分的收集液混合, 經凍乾後, 於 4°C 下通過 protein A 管柱 (2cm/2.5cm; Bio-Rad) 再以 3.5M NaSCN pH6.5 (Sigma) 將免疫球蛋白 G 劃分沖出, 以自動收集器收集, 測吸光並進行電泳分析。

三、抗體的製作與精製

取經由純化及精製過後的免疫球蛋白 G 溶液與 Freund's complete adjuvant (Difco) 等量混合形成乳濁液, 對兔子進行皮下注射, 反覆隔週追加注射, 並採血以雙向免疫擴散法 (double diffusion)⁽⁹⁾ 及免疫電泳 (immunoelectrophoresis)⁽¹⁰⁾ 來確定抗體的產生及抗血清是否具有單一特異性, 經再次追加注射免疫, 於一週後將兔子犧牲、採血, 所得到的血漿再經過 Bovine serum globulin 管柱 (7cm/1.5 cm) 以 3.5M NaSCN pH6.5 沖出純化的抗體。

四、抗體的標識

依 Nakane、Kawaoi 及 Tijssen、Kurstak 所發展的方法^(11,12), 製得酵素抗體結合體 (enzyme-antibody conjugate), 並以三明治型酵素連結免疫吸附分析法⁽¹³⁾ 定出結合體的效價 (titration)。

五、標準檢量線的製定

經純化的免疫球蛋白 G 配製成濃度為 5 μ g、1 μ g、500ng、100ng、50ng、10ng/ml 的標準溶液, 以三明治型酵素連結免疫吸附分析法分析, 以溶液濃度與吸光值繪製標準檢量線圖。

六、生、鮮乳中免疫球蛋白含量的測定

96 孔的分析盤 (Nunc), 每孔分別注入濃度為 16 μ g/ml 的兔子抗牛血清免疫球蛋白抗體 100 μ l, 置於 37°C 的培養箱內隔夜培養, 使抗體附著後, 以 0.01M Phosphate buffer saline pH7.4 (PBS) 清洗, 加入 2% gelatin 350 μ l blocking 培養後以 PBS 清洗, 再加入檢體及標準液於室溫下混合, 經清洗後加入稀釋的結合體, 於室溫下混合, 清洗後加入發色劑 (10 μ l 35% H₂O₂/9ml H₂O 與 10 mg o-phenyldiamide; (Sigma)/1ml methanol 混合) 經 30 分鐘遮光反應後加入 1N H₂SO₄ 溶液終止發色反應, 以 96 孔用酵素免疫分析閱讀儀 (Σ 960, Metertech) 於 490 nm 波長下判讀其吸光值。

七、總蛋白量的測定

以牛血清白蛋白 (albumin, Sigma) 作為標準液, 利用 protein assay kit (Bio-Rad) 定量牛乳中所含總蛋白量。

結果與討論

牛乳與乳製品是一種重要畜產品, 歐美人民早已飲用多年, 在台灣隨著經濟的成長、生活水準的提高及農政單位的推廣, 使得近年來乳品的攝取量與消耗量增加, 成為大眾化的飲食。就營養學的觀點看來, 牛乳是一種營養價值相當高的食品, 可同時供給豐富的蛋白質、乳鈣質及維生素等等。牛乳的飲用亦可幫助成長的兒童及青少年身體組織的建造、預防或延遲中老年如骨骼疏鬆等現象。目前市面上販售的鮮乳, 一般均以標榜由純正的牛乳製成。但就台灣酪農業現況, 乳產量並不足供應市場需求。而對於鮮乳內還原乳的檢出, 也已有許多報告提出。這些方法主要是基於牛乳加熱時由乳清蛋白質所生成的鐵氰化合物還原物質會增加, 稱之為蛋白還原物質 (protein-reducing substance) 利用與鐵氰化鉀 (potassium ferricyanide)^(1,2)、刃天青 (resazurin)^(3,4) 與磷酸鉬 (phosphomolybdic acid)^(5,6) 反應以比色法檢出, 同時也有由乳清變性氮及總鈣量⁽⁷⁾ 加以測定的方法。但基於各廠於加工時的條件不甚相同, 往往會影響成品組成上的差異, 因此也沒有一套可鑑定鮮乳純度標準可遵循。本篇的研究主要是基於由 SDS-PAGE 分析上發現生、鮮乳中的免疫球蛋白 G 色帶顏色的差異 (圖一), 故加以確立並進一步利用三明治型酵素連結免疫吸附分析法來分析及觀察比較生、鮮乳中的免疫球蛋白劃分含量上差異的可行性。

圖三、四是以雙向免疫擴散法 (double im-

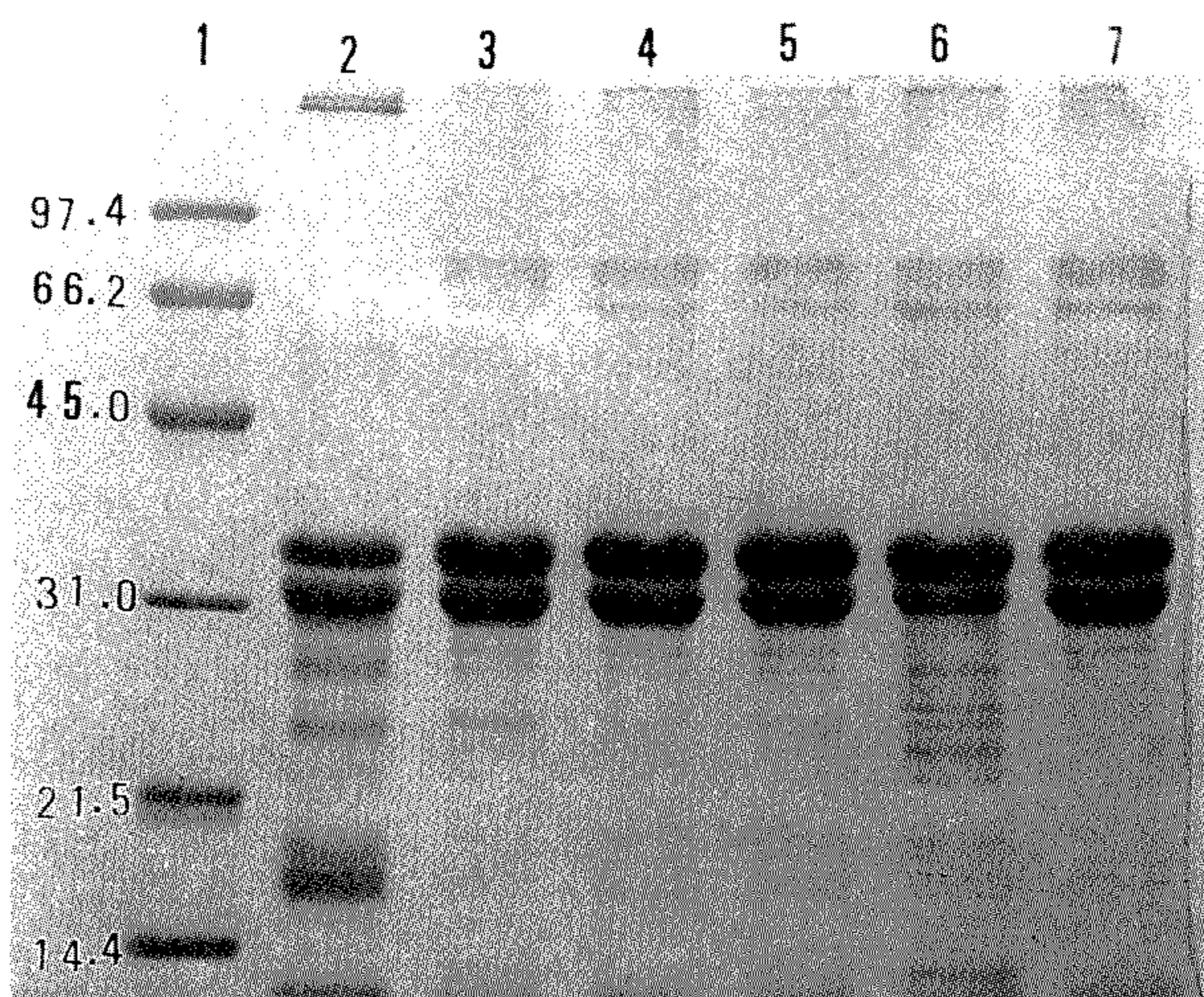


Fig 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the raw and fresh milk after ammonium sulfate precipitation. The molecular weight (KDa) of low molecular weight standards (Bio-Rad) are indicated on the right. Low molecular weight standards included phosphorylase b (97.4 KDa), albumin (66.2 KDa), ovalbumin (45.0 KDa), carbonic anhydrase (31.0 KDa), soybean trypsin inhibitor (21.5 KDa), and lysozyme (14.4 KDa). Lane 1, low weight molecular standards; lane 2, the raw milk; lane 3-lane 7, the commercial fresh milk.

munodiffusion) 及 免疫電泳分析法 (immunoelectrophoresis) 分析純化出的免疫球蛋白G (圖二) 免疫兔子後所得抗血清中其抗體的產生及專一性。圖三中由抗血清與純化的免疫球蛋白G反應產生免疫沈降線的觀察, 可以確定抗體的產生。再以純化的免疫球蛋白G及牛乳同時進行電泳後, 與抗血清反應。而由圖四上下的免疫沈降線的對照, 可看出在溝兩旁的相對位置上各出現一條沈降線, 在槽中注入牛乳的一邊, 除這條沈降外並沒有其他沈降線的出現, 由此可知所得到的抗血清具有單一特異的特性。可將此抗血清通過bovine serum globulin管柱, 以親和層析法純化兔抗牛血清免疫球蛋白劃分抗體。純化出的抗體一部分作為覆蓋在微量分析盤上的capture antibodies, 另一部分則標識上Horseradish peroxidase, 利用三明治型酵素連結免疫吸附分析法追蹤牛乳中免疫球蛋白含量的變化。圖五、六分別為經過標識後的抗體——酵素接合體以酵素連結免疫吸附分析法所測出的效價(titration)及所能分析的範圍。由分析的結果得到接合體最適當的稀釋濃度為500倍; 另

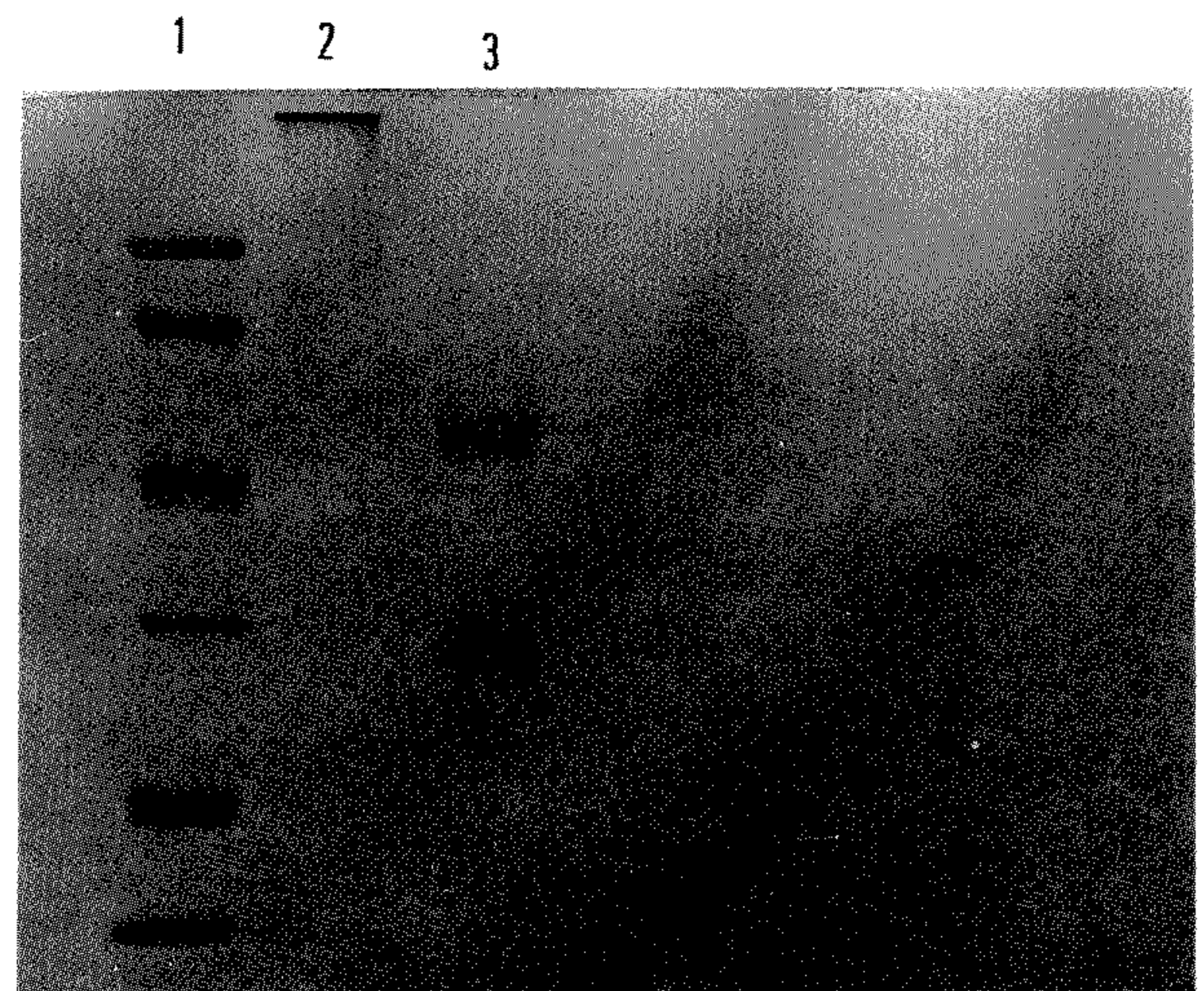


Fig 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified IgG on a 12% SDS-polyacrylamide gel. lane 1, low molecular weight standards; lane 2, purified IgG under nonreducing condition; lane 3, purified IgG under reducing condition.

若以吸光值與 $\ln(\text{immunoglobulin})$ 作圖可得到一線性關係良好的劑量——反應檢量線(dose-response standard curve), 檢出濃度則在 $1\mu\text{g/ml}$ 至 10ng/ml 之間。顯示以此三明治型酵素連結免疫吸附分析法可準確的定量出檢體中免疫球蛋白劃分含量的變化。

在確立以三明治型酵素連結免疫吸附法偵測檢體中免疫球蛋白含量的變化的可行性後, 接著進一步追蹤生、鮮乳中免疫球蛋白劃分 (immunoglobulin fraction) 含量的變化。發現自東海大學牛乳加工廠取得之牛乳中免疫球蛋白劃分的濃度為 $140.73 \pm 16.99\mu\text{g/ml}$, 一般市售鮮乳中的濃度為 $0.16 \pm 0.017\mu\text{g/ml}$ 至 $0.28 \pm 0.04\mu\text{g/ml}$ 不等 (圖七); 二者間濃度差異相當大。但如在總蛋白濃度的比較上則無明顯的差異 (圖八)。由於生乳及各廠牌鮮乳中總蛋白量上仍有些許差異, 若單用單位體積中免疫球蛋白劃分濃度變化的比較, 較無法客觀比較, 故以免疫球蛋白劃分含量與總蛋白量相比而得到一個校正值 (圖九), 比較在每毫克總蛋白量中所含的免疫球蛋白劃分含量的差異, 可發現鮮乳比值與奶粉相近, 而均遠低於生乳。

由於在牛乳的製備過程中加熱是不可缺少的一環, 為了了解此加工過程對生乳中免疫球蛋白含量的影響, 本研究參考巴斯德滅菌的條件, 在 70°C 、加熱30分鐘後, 發現乳清蛋白質中的免疫球蛋白劃分約有65%會變性, 但殘存量仍遠較市售鮮乳

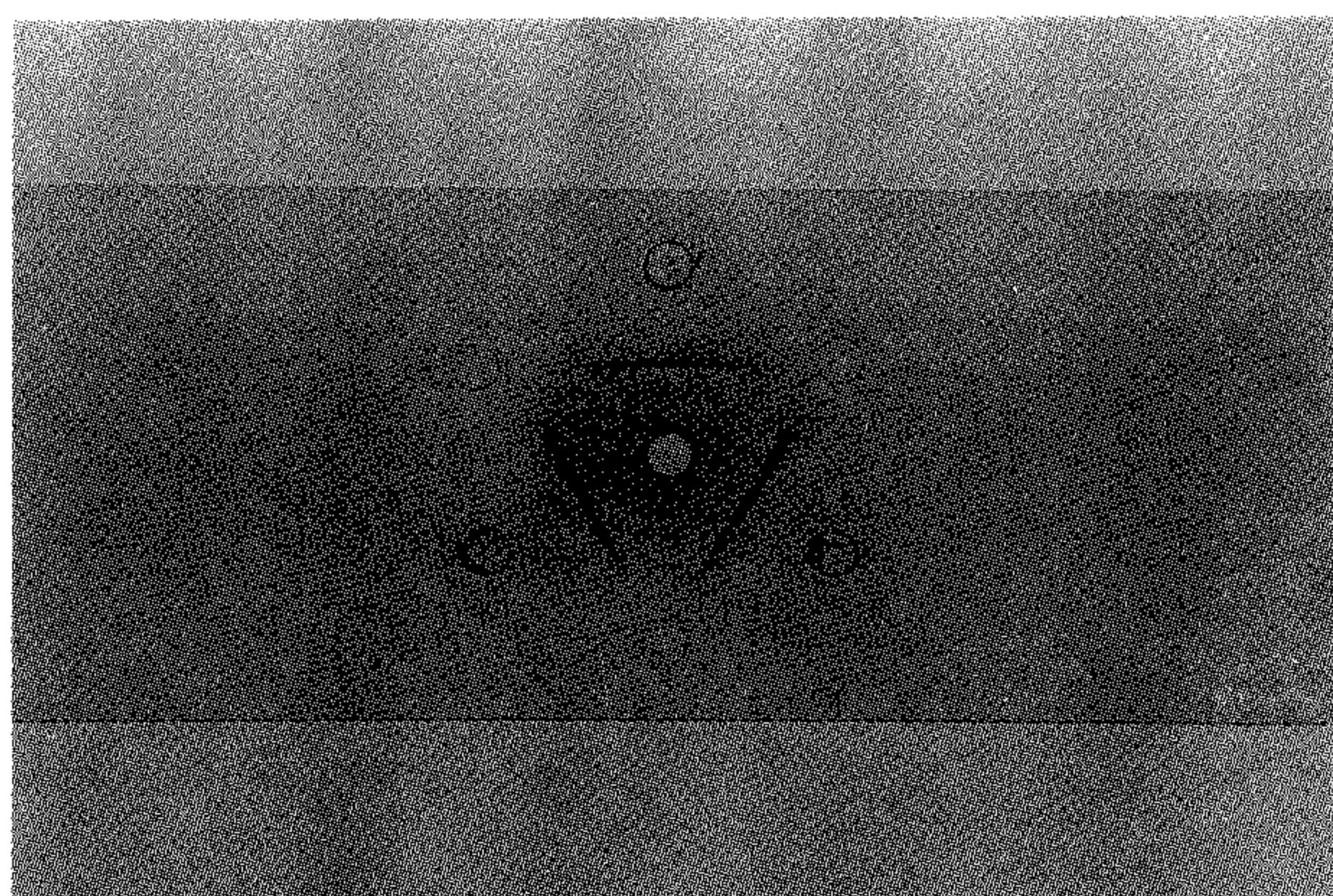


Fig 3. Immunodiffusion precipitation reaction of the purified IgG against rabbit antiserum to bovine IgG. Peripheral wells, purified IgG; central well, rabbit antiserum to bovine IgG.

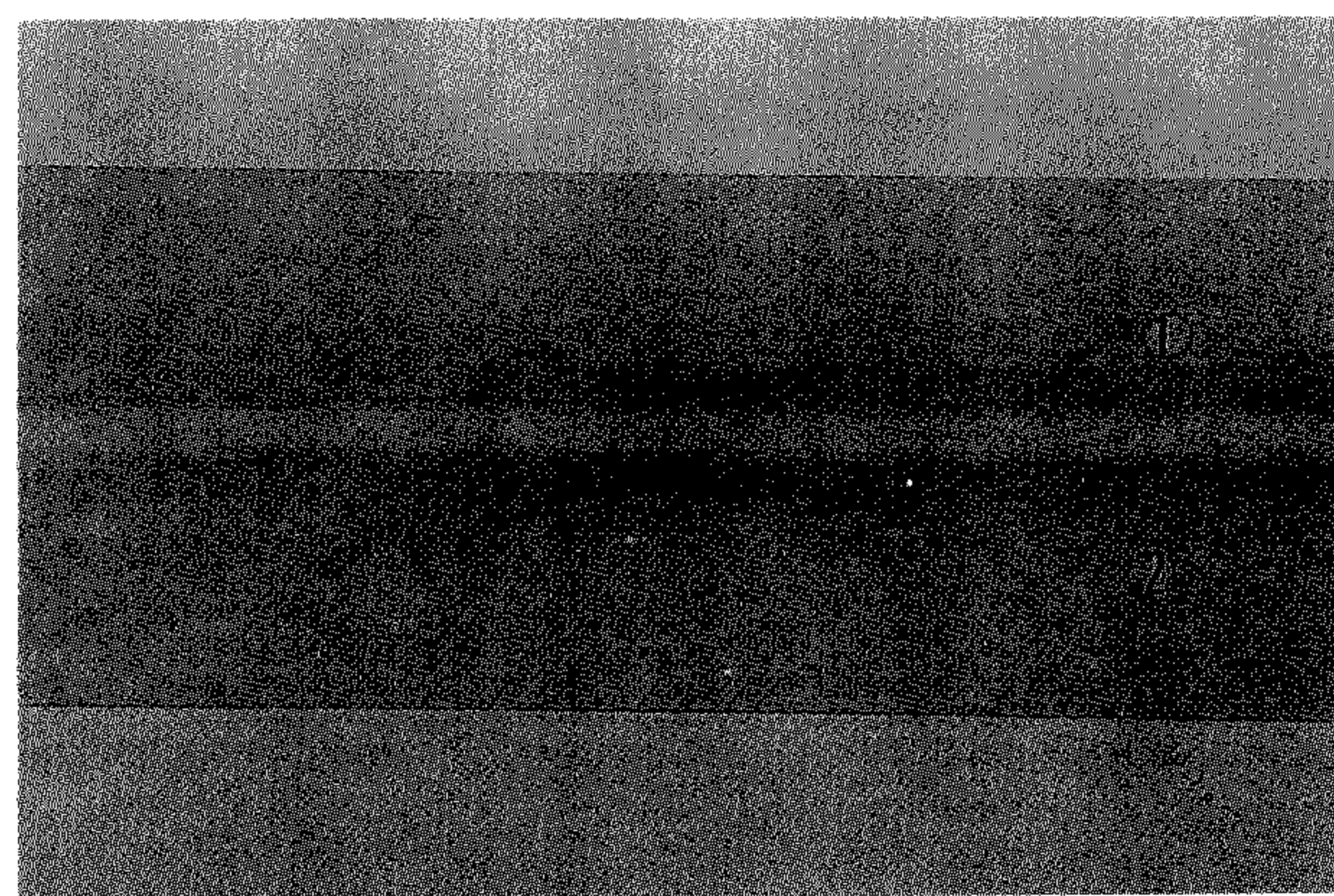


Fig 4. Immunoelectrophoresis of the purified IgG and raw milk after ammonium sulfate precipitation. well 1, the purified IgG; well 2, the raw milk after ammonium sulfate precipitation. Trough, rabbit antiserum to bovine IgG.

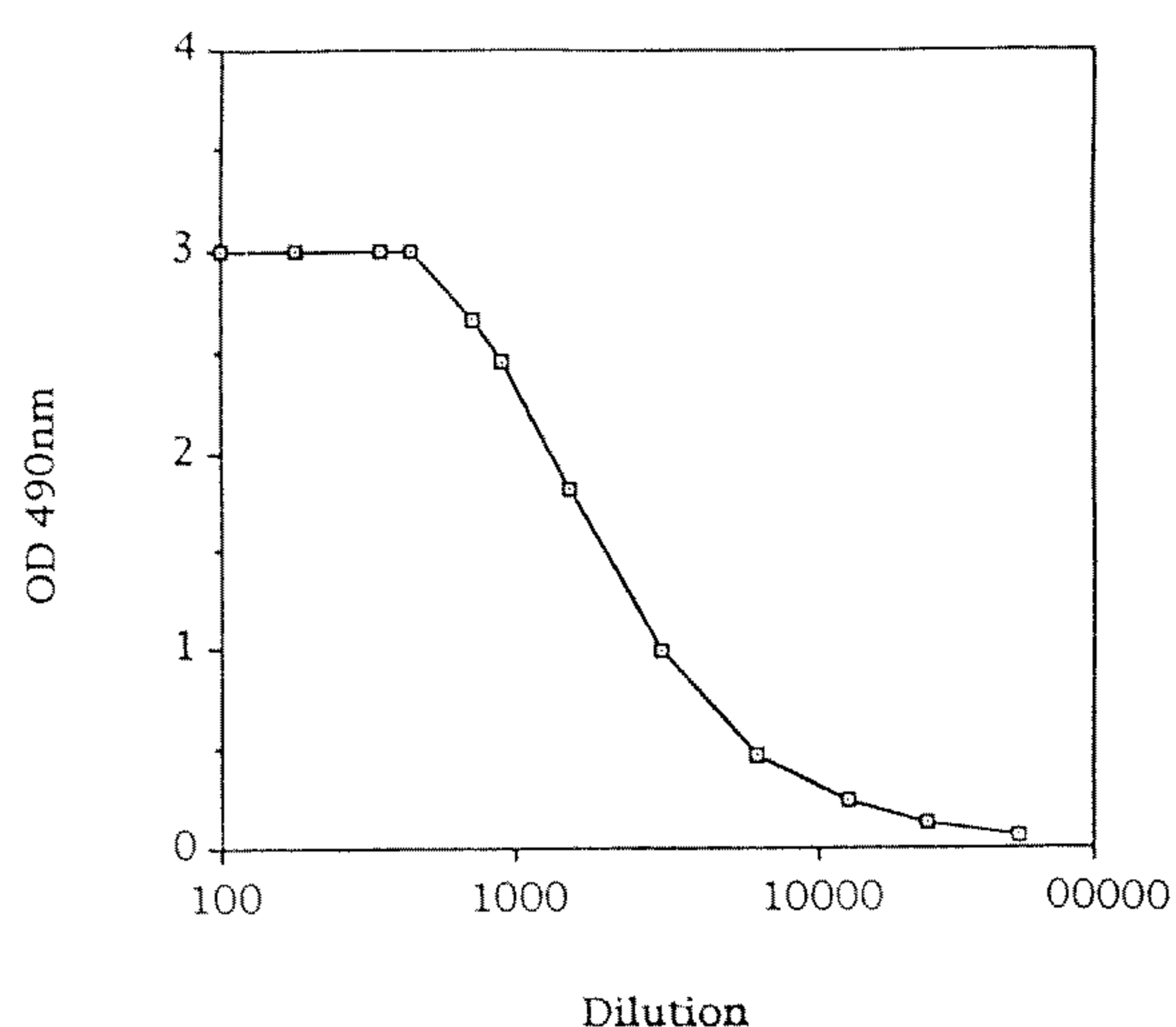


Fig 5. Titration of horseradish peroxidase conjugate.

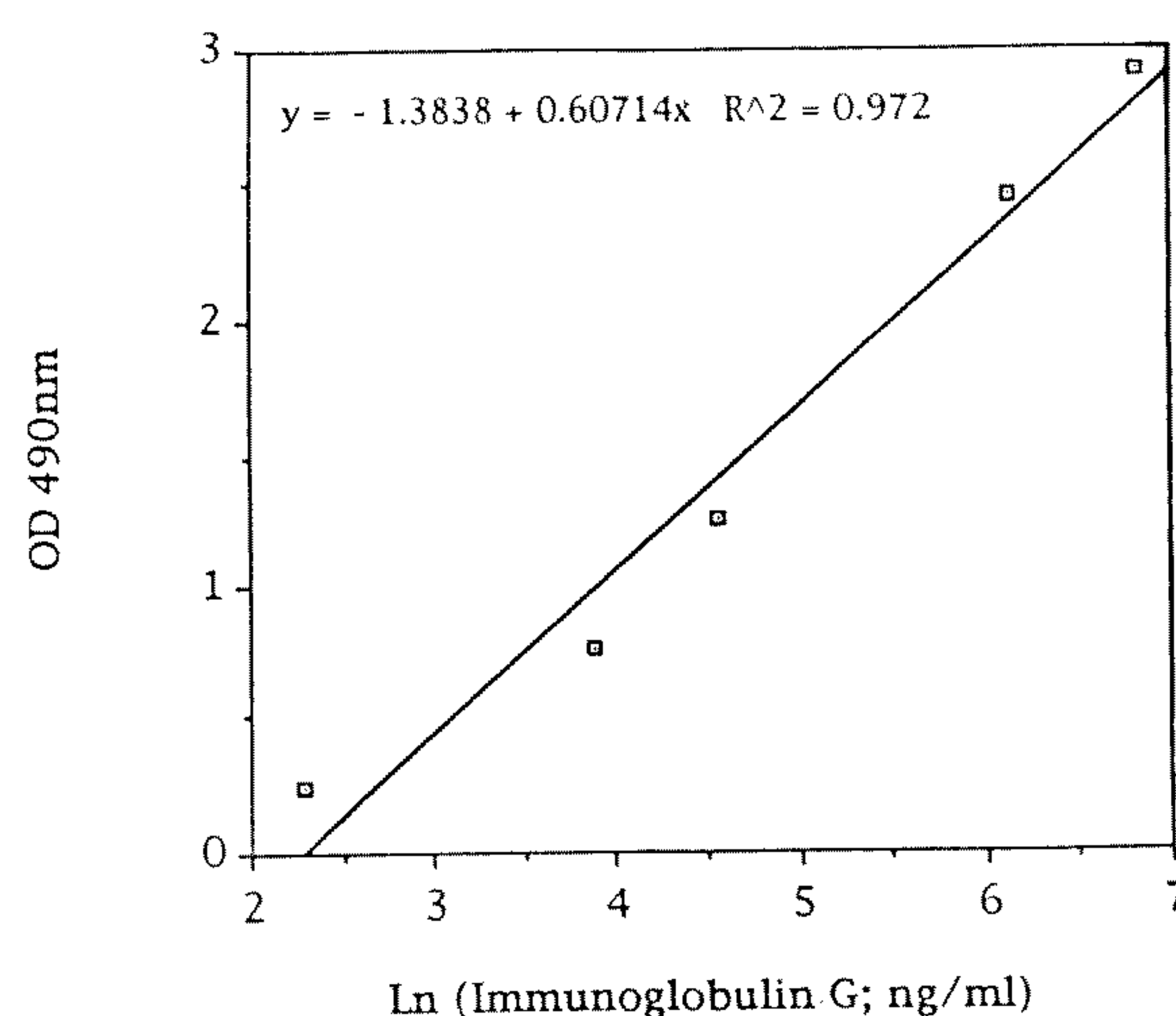


Fig 6. Standard curve of immunoglobulin G.

為高。由以上的結果顯示加熱的過程的確會使生乳中的免疫球蛋白含量的降低,但經過處理後的生乳與鮮乳間免疫球蛋白的含量仍有極明顯的差異,兩者的相差約200倍,而對此差異的解釋可能有三:一為加熱的條件不同而導致免疫球蛋白的殘存量的差異;免疫球蛋白為對熱敏感之蛋白,但由於氣候的濕度及環境污染的嚴重使廠商為顧慮食品衛生安全而採用較高的加工溫度,使一般鮮乳中免疫球蛋白的含量大量降低而有所影響。二為在加工過程中其他步驟的影響,如均質等,會使免疫球蛋白變性,三是檢測的牛乳中可能參有乳粉

成品而稀釋了其中免疫球蛋白劃分的含量,值得更進一步的探討,另外,由於乳牛乳汁的分泌量及乳汁成份會受到許多因素的影響,例如四季、氣候、飼料、環境等,所以需要再深入探討這些影響因子,以期建立更完整的資料,使牛乳中的免疫球蛋白可否做為代表生乳純度的參考指標。

誌謝

感謝東海大學農學院院長施宗雄博士、實習農

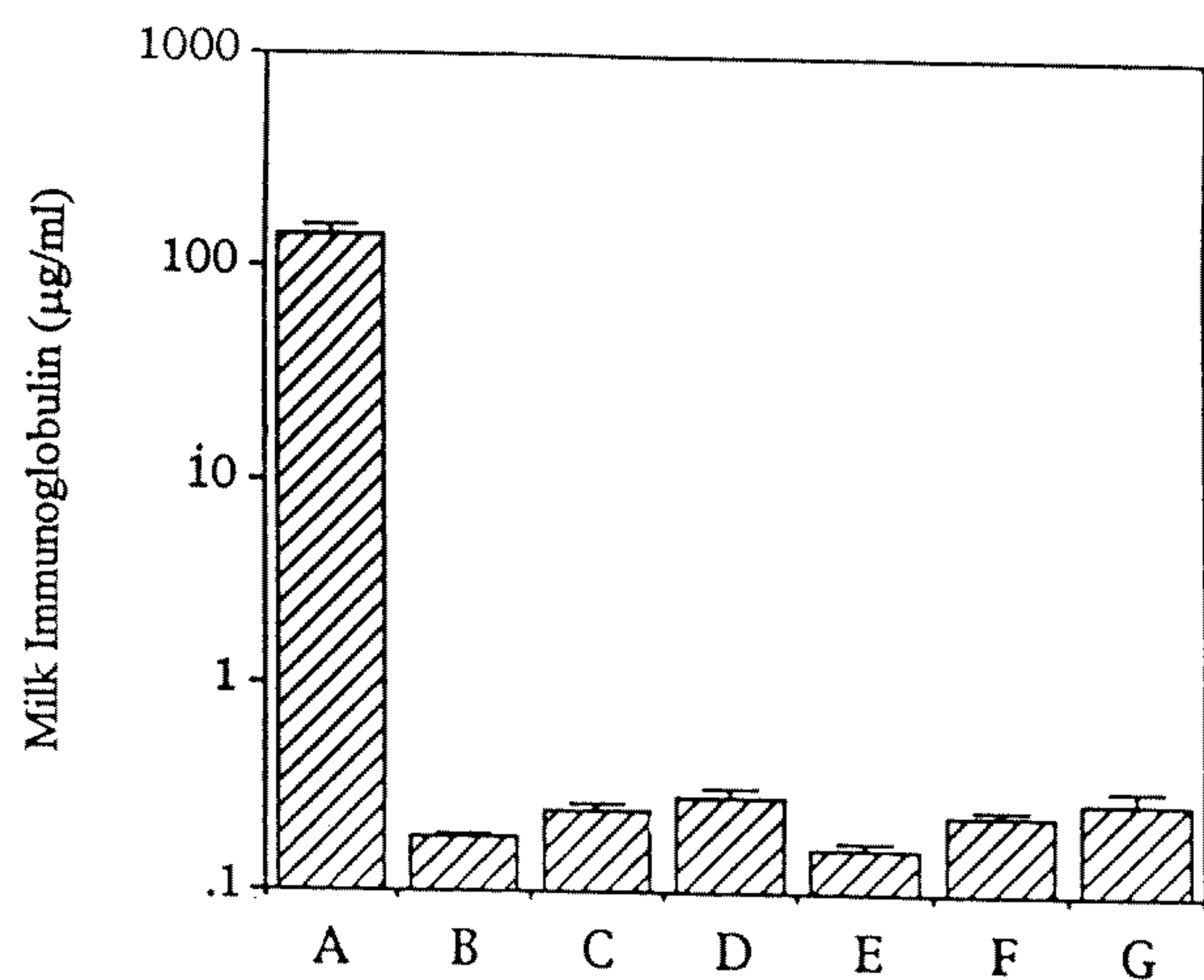


Fig 7. Comparison on immunoglobulin concentration in the raw, fresh and powder milks. A, raw milk, B-F are commercial milks. G, powder milk.

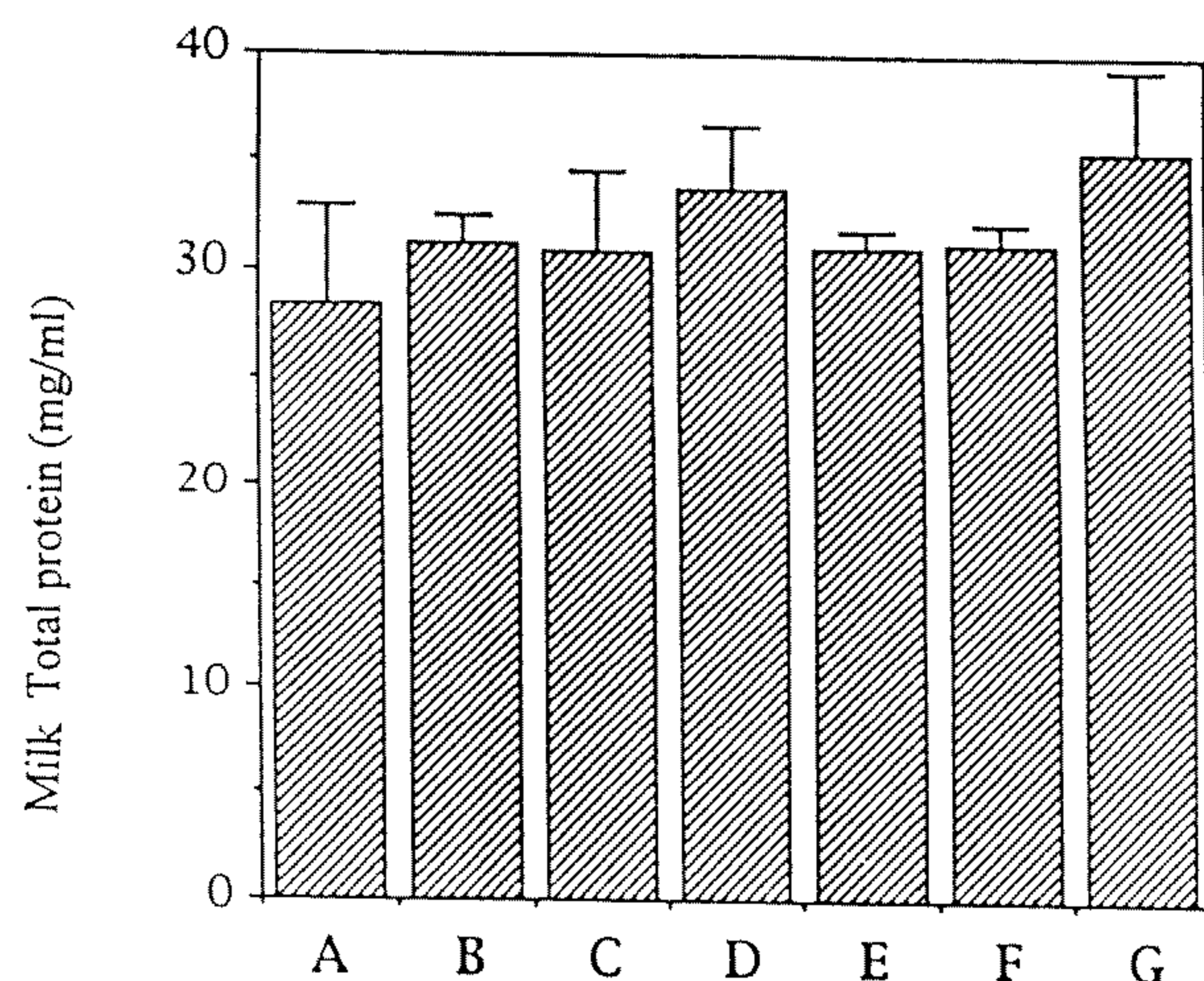


Fig 8. Comparison on total protein concentration in the raw, fresh and powder milks. A, raw milk, B-F are fresh milks. G, powder milk.

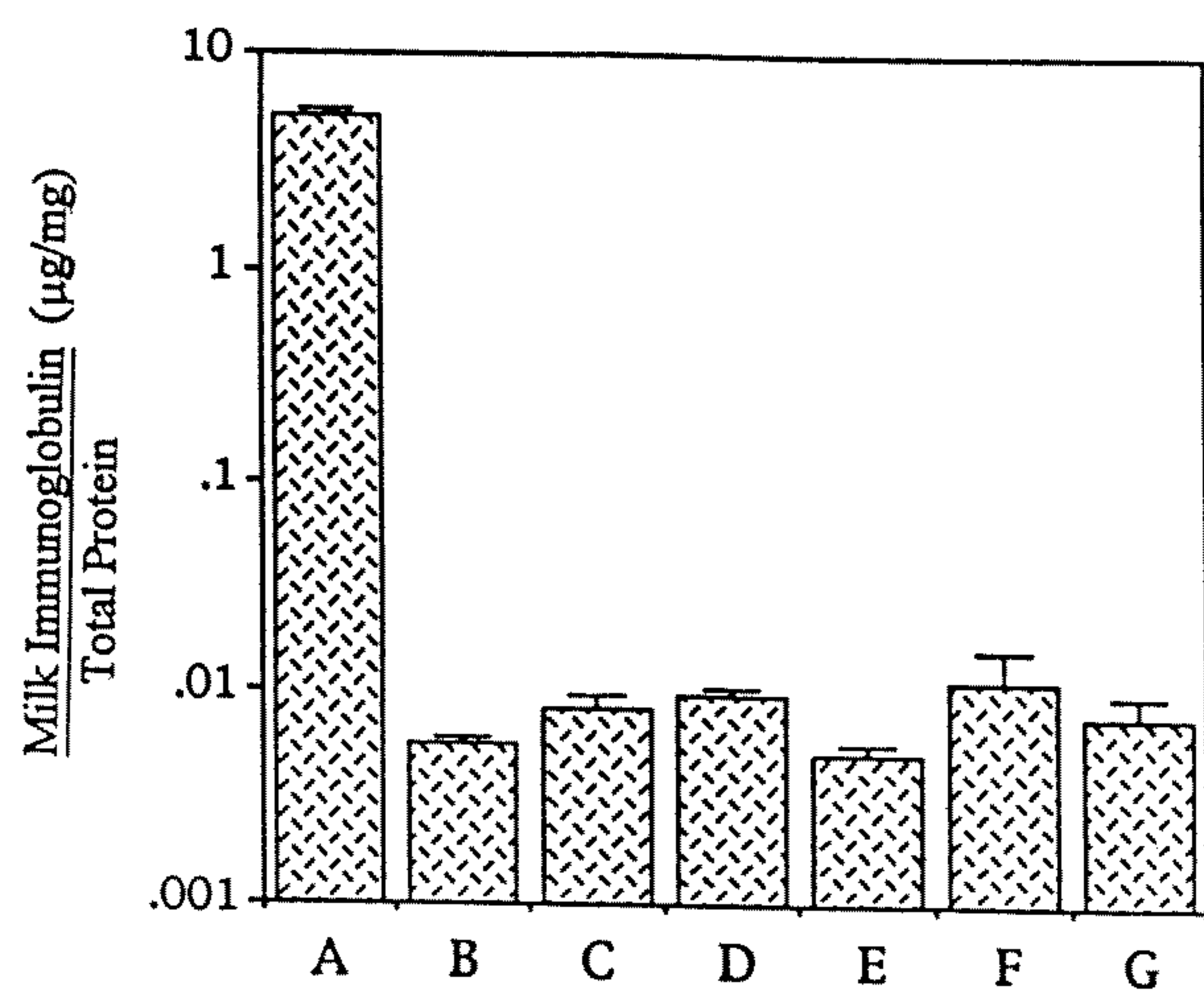


Fig 9. Comparison on the immunoglobulin concentration of total protein in the raw, fresh and powder milks. A, raw milk, B-F are fresh milks. G, powder milk.

牧場牛乳加工場長周繼發博士及實習農牧場牛乳加工廠楊文嘉廠長提供生乳樣品,特此誌謝;本研究承蒙中山醫學院研究經費補助(計劃編號CSMC-83-NS-B-031)謹致謝忱。

參考文獻

1. Cardwell, J.T., and Herzer, F.H. 1958. A Stu-

dy of Factors which Cause Variations in the Protein-reducing Value of Fluid Milk. *J. Dairy Sci.* 41:702.

2. Hobbs, W.E., and Coulter, S.T. 1962. Characterization of the Substances in Raw and Heated Milk that are Responsible for Reducing Acid Ferricyanide. *J. Dairy Sci.* 45:661.

3. Toubal, V. 1960. Colour Reaction of Resazurin Fresh Milk Containing Added Reconstituted Milk. *Lait.* 40:18.

4. Bell, G., and Casper, P. 1959. Colorimetric Method of Indicating the Presence of Reconstituted Dried Milk. *Lait.* 39:241-245.

5. Murthy, G.K., and Kaylor, L. 1971. Detection of Non-fat Milk in Whole Milk. *J. Dairy Sci.* 54:82.

6. Mishra, M. 1966. A Simple and Rapid Test for Detection of Skim-milk Powder in Whole Milk. *Indian Vet. J.* 43:160-161.

7. Chang, S.S., Lin, J.Y., Mei, H.M. and Shih, C.N. 1966. Testing of Raw Milk Adulteration. XVII Int. Dairy Congr. B239.

8. Laemmli. 1970. Cleavage of Structure Proteins during Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.

9. Ouchterlony, Ö. 1958. *Progr. Allergy.* Kallos, P. and Waksman, B.H. (eds), Karger, Basel.

- V.1.
10. Grabar, P. and Williams, Jr., C.A. 1953. Biochim. Biophys. Acta, 10, 193.
11. Paul, k. Nakane and Akira, Kawaoi. 1974. Peroxidase-labeled Antibody. A New Method of Conjugation. J. Histochem. Cytochem. 22: 1084.
12. P. Tijssen and E. Kurstak. 1984 Highly Efficient and Simple Method for Preparation of Peroxidase and Active Peroxidase-antibody Conjugate for Enzyme Immunoassay. 136: 451.
13. Engvall, E., and Perlmann, P. 1971. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA): Quantative Assay of IgG. Immunochemistry. 8:871.

The Comparison of Immunoglobulin Level in the Raw and Fresh Milk.

MEI-YING LIU, SI-TSE JIANG * AND CHENG-CHIN HSU

Institute of Nutritional Science, Chung Shan Medical & Dental College
School of Medical Technology, Chung Shan Medical & Dental College*

ABSTRACT

In addition to analysis of the immunoglobulin concentration in milk by traditional sandwich enzyme-linked immunosorbent assay methods, we have further observed the difference of the immunoglobulin concentration between the raw and fresh milk.

Protein of untreated raw milk, provided by the milk plant of Tunghai University, and commercial fresh milks were separated by ammonium sulfate precipitation. The variances of proteins between raw and fresh milk were compared by using SDS-polyacrylamide electrophoresis. The results showed by comparing the

bands that there was a difference in immunoglobulin G between the raw and the fresh milk. The bovine immunoglobulin G of the raw milk was further isolated and purified. A monospecific antiserum was prepared. The technology of sandwich ELISA was conducted to analyze and observe the difference of immunoglobulin concentrations between raw and fresh milk.

Raw milk contained $140.73 \pm 16.99 \mu\text{g/ml}$ and that varied from $0.16 \pm 0.017 \mu\text{g/ml}$ to $0.28 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ in fresh milk. The content of immunoglobulins might be one of the indicators to evaluate heat treatment of milks.

Key Words : Immunoglobulin G, sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE, enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA.