

# 利用白色來亨雞及龍門蛋雞生產抗大腸桿菌 蛋黃免疫球蛋白 (IgY) <sup>(1)</sup>

劉振發<sup>(2)(5)</sup> 林玉芬<sup>(3)</sup> 連塗發<sup>(3)</sup> 蕭振文<sup>(2)</sup>

許義明<sup>(2)</sup> 劉瑞珍<sup>(2)</sup> 戴謙<sup>(4)</sup> 陳立人<sup>(2)(4)(5)(6)</sup>

收件日期：98年11月13日；接受日期：99年1月22日

## 摘要

本研究旨在進行兩個不同品種蛋雞對大腸桿菌免疫後之專一性免疫蛋黃球蛋白 (IgY) 生產效能的探討。專一性免疫蛋黃球蛋白 (IgY) 生產，是選用市售的四合一疫苗其中包含豬大腸桿菌 k88、k99、987P、F41 等四種纖毛（簡稱為 CM 抗原）及源自民間豬腸分離引起仔猪下痢的大腸桿菌株為抗原（簡稱為 AF 抗原），以肌肉注射的方式對來亨蛋雞和龍門蛋雞進行免疫注射。蛋黃中抗大腸桿菌專一性 IgY 抗體是以水溶液分離法（water dilution method）來進行分離，並利用抑菌測試進行專一性 IgY 抗體功效評估。來亨蛋雞和龍門蛋雞經免疫後所生產抗 CM 抗原的專一性抗體分別為 65.28  $\mu\text{g/mL}$  WSF（water soluble fraction）和 55.78  $\mu\text{g/mL}$  WSF；另外在 AF 抗原的專一性抗體則分別為 48.31  $\mu\text{g/mL}$  WSF 和 14.4  $\mu\text{g/mL}$  WSF。在抑菌測試結果顯示來亨蛋雞所生產的 CM 抗原的專一性抗體，在 63  $\mu\text{g/mL}$  WSF 濃度具有抑制大腸桿菌生長的效果。

關鍵詞：蛋黃免疫球蛋白、大腸桿菌、雞。

## 緒言

雞蛋為價廉卻有高蛋白含量及重要營養成分的食品，包括 riboflavin、selenium 和 vitamin K 等，此外雞蛋也是目前應用廣泛的多功能性原料之一。雞蛋整體上含有三個部分：蛋黃、蛋白及蛋殼，而以蛋黃是其中應用最廣的部分。蛋黃佔整顆雞蛋重量約 31%，其主要成分為 51% 水分、

---

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1549 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所家畜生理組。

(3) 國立嘉義大學動物科學系。

(4) 南台科技大學。

(5) 國立成功大學生物科技研究所。

(6) 通訊作者，E-mail：lrchen@mail.tlri.gov.tw。

16% 蛋白質、30.5% 脂質和其他次要組成物，而蛋白質主要分佈在 yolk granule 和 yolk plasma。在 yolk granule 包含 phosvitin、 $\alpha$ - and  $\beta$ -lipovitellins 和脂溶性 low-density lipoproteins, yolk plasma 包含  $\alpha$ -、 $\beta$ - and  $\gamma$ -livetins 三種水溶性 lipoproteins, 其中  $\gamma$ -livetins 經分析後發現是一種 IgG-like 的免疫球蛋白 (Polson *et al.*, 1980), 因為從蛋黃 (yolk) 中發現, 因而目前多被稱為 IgY (immunoglobulin of egg yolk)。

家禽之蛋黃中含有來自母禽免疫產生之抗體是在多年前就為人所發現 (Klemperer, 1893)。由於家禽蛋中的抗體存在於蛋黃, 因此稱為 IgY, 一隻雞如果以傳統免疫法免疫, 每隻雞每個月約可生產 1,500 mg 的 IgY, 其中 2-10% 是具特異性抗體 (Schade *et al.*, 1994)。另外, 利用雞蛋生產抗體除了可以不必犧牲動物的好處外, 更由於人類與禽類之遺傳距離遠, 人類蛋白質在家禽較易引起免疫反應 (Gassmann *et al.*, 1990)。而且 IgY 的純化步驟也有多篇研究有所探討, 顯示 IgY 的純化過程並非十分困難 (Akita and Nakai, 1993)。由於上述多項優點, 利用禽蛋生產抗體漸受重視, 曾有人利用 IgY 方式生產對抗大腸菌 (Yokoyama *et al.*, 1992; Amaral *et al.*, 2002; Owusu-Asiedu *et al.*, 2002)、幽門桿菌 (Shin *et al.*, 2002)、沙門氏桿菌 (Lee *et al.*, 2002)、牛冠狀病毒 (Ikemori *et al.*, 1997)、狂犬病毒 (Sun *et al.*, 2001) 或輪狀病毒 (Sarker *et al.*, 2001) 等多項研究, 多數研究皆可獲得抗體, 減輕病原之影響。

腸型大腸桿菌 (Enteropathogenic, *Escherichia coli*) 的感染為引起仔豬下痢原因之一, 早發性大腸菌症常在出生後 10 小時到 7 日內發生, 仔豬有下痢、不吮乳、全身乏力、後軀麻痺、常在兩天內死亡, 死亡率高達 100%, 若較大時發病則死亡率為 70%; 而遲發性大腸桿菌症則在 2-4 週齡時發生, 先發生黃色軟便, 後轉變為慢性化白痢, 雖死亡率較低, 但是育成會受影響, 而離乳後 3-4 天也會發生大腸菌引起之下痢, 若未治療死亡率也可達 10%, 其生長速率降低, 使成本提高很多。

這些由大腸菌引起之仔豬下痢目前可用口服或注射抗生素來治療, 或是讓母豬在分娩前口服自家活菌疫苗以預防仔豬早發性大腸桿菌下痢。雖然應用抗生素可以治療大腸桿菌, 但是對仔豬成長已造成影響, 而且有些小豬在治療前即已死亡。而且, 繼歐盟之後, 飼料中禁用抗生素即將成為家畜禽飼養的普遍規範。是故非使用抗生素之豬隻大腸桿菌症預防與治療新方法的開發, 值得深入探討與研究。利用禽蛋生產抗大腸桿菌纖毛之 IgY 添加於仔豬教槽飼料中, 以預防或治療仔豬因感染大腸桿菌發生的下痢現象, 似為一個可行的方式。本研究以市售大腸桿菌四合一疫苗 (含豬大腸桿菌 k88、k99、987P、F41 四種纖毛) 及從民間豬腸分離引起仔豬下痢的大腸桿菌為抗原來免疫白色來亨雞及龍門蛋雞, 以探討不同蛋雞品種對抗大腸桿菌之 IgY 抗體生產效率的比較。

## 材料與方法

### I. 試驗動物

本試驗使用 23 週齡的白色單冠來亨蛋雞及龍門蛋雞各 6 隻, 作為大腸桿菌免疫刺激之處理及特異性抗體之收集用。

### II. 抗原種類

本試驗以市售的四合一疫苗 (沙氏豬大腸桿菌四價不活化菌苗; Fort Dodge Laboratories, Inc. USA) 其中包含豬大腸桿菌 k88、k99、987P、F41 等四種纖毛 (簡稱為 CM 抗原) 及民間豬腸分離引起仔豬下痢的大腸桿菌株為抗原 (簡稱為 AF 抗原)。

### III. 抗原製備

源自民間豬場下痢仔豬腸道分離的菌株以胰化酪蛋白大豆培養液 (trypticase soy broth) 在 37°C 下培養隔夜後，調整菌數量為  $2 \times 10^{10}$  CFU/mL。然後以  $2000 \times g$  離心 15 分鐘，去除上清液並以磷酸緩衝溶液 (phosphate buffered solution, PBS) 將沉澱物重新懸浮，經添加 0.4% 福馬林 (formaldehyde)，再於 37°C 培養 16 小時，進行抗原不活化處理，再以  $2000 \times g$  離心 15 分鐘，棄上清液後將沉澱物以 PBS 重新懸浮溶解，即完成大腸桿菌不活化菌液抗原的製備，放置於 -70°C 冰箱冷凍備用。

### IV. 雞隻的免疫注射

進行雞隻的免疫注射前，先將抗原以蛋白質的含量來進行定量，將兩種抗原蛋白質的含量調整為 200 mg/mL 濃度做為免疫注射的濃度。將抗原與弗氏完全佐劑 (Freund's complete adjuvant) 以 1:1 比例調配成乳化狀液，對母雞進行注射。每隻母雞於左右胸部肌肉分為四個區塊，各注射 0.5 mL，並在第一次免疫注射後間隔 2、6、12 及 16 週施行補強免疫注射。進行補強免疫注射時，改用弗氏不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant)，整個免疫流程約 24 週。另外雞隻在每次免疫前，先從翼下靜脈採血 2 mL 並分離血清存放於 -70°C 冰箱供日後抗體分析。

### V. 免疫蛋收集

自免疫注射前一週開始收蛋 (控制組)，以每隻雞為單位，將其每週所生之免疫蛋收集，進行蛋黃與蛋白分離，僅收取蛋黃部分，並將每週第 3 天所生產的免疫蛋分離的蛋黃個別進行冷凍乾燥以分析專一性 (*E.coli*) 抗體力價，了解在整個免疫的過程中，雞隻的免疫反應情形。其餘天數所收取之蛋黃混合，存放於 -20°C 備用，每週皆以相同方式進行，持續收蛋到最後一次免疫完成後的第 6 週。

### VI. 蛋黃中 IgY 抗體分離與純化

蛋黃中 IgY 抗體分離與純化以水溶液分離法 (Akita and Nakai, 1992) 進行，取經過冷凍乾燥後的蛋黃粉 15 g 以 20 倍 (300 mL) 去離子水溶解，及未經冷凍乾燥蛋黃 30g 以 10 倍 (300 mL) 去離子水溶解，變成蛋黃液後調整 pH 至 5.0，隔夜再將 pH 由 5.0 調至 7.0，離心 ( $700 \times g$ , 40 分鐘, 4°C)，取上清液以濾紙過濾，最後的過濾液為 water soluble fraction (WSF)，即 IgY 抗體。

### VII. 血清中與蛋黃中專一性 IgY 的分析

IgY 抗體力價分析，以商業套組進行 ELISA 分析，先以 BSA 稀釋成 5 mg/mL、2.5 mg/mL、1.25 mg/mL、0.625 mg/mL、0.3125 mg/mL 及 0.156 mg/mL 的濃度，定出標準曲線，再以此標準曲線算出抗原的濃度，進一步利用 ELISA 進行 IgY 抗體力價的分析，分析步驟如下：

第 1 天先求出抗原濃度，再測試最佳之抗原用量，在 96 孔反應盤中之小孔中加入 100  $\mu$ L 之抗原進行抗原 (10  $\mu$ g/mL) 的塗抹 (coating)，在標準曲線的反應小孔加入 100  $\mu$ L 的 anti-chicken IgY (10  $\mu$ g/mL) (Sigma C2288)，置於冰箱中 (4°C) 作用至次日。

第 2 天將蛋黃粉做 20 倍稀釋成蛋黃液 (0.5g 蛋黃粉加入 10 mL 去離子水置於 15 mL 離心管中震盪混勻)，冷凍備用。將第 1 天 96 孔反應盤從冰箱中取出，用 PBS 沖洗 3 次，再於每小孔中加入 200  $\mu$ L 的 2% BSA 後，置於冰箱中 (4°C) 作用至次日。

第 3 天在標準曲線中每小孔分別加入 100  $\mu$ L 不同濃度 (0.5、0.25、0.125、0.06、0.03、0.015  $\mu$ g/mL) 的 1 級抗體 (monoclonal anti-chicken IgG)。在樣品分析的小孔部分則將第 2 天已

製備完成的 20 倍稀釋之蛋黃液，再稀釋 100 倍後於每個檢測小孔加入 100  $\mu$ L，置於冰箱 (4°C) 作用至次日。

第 4 天取出 96 孔反應盤，使用含有 0.05% tween 20 的 PBS 溶液沖洗 3 次，再以 PBS 溶液沖洗 1 次以去除泡沫。隨後每個檢測小孔加 2 級抗體 (alkaline phosphate-conjugated goat anti-chicken IgY) 100  $\mu$ L，置於 37°C 作用 2 小時。2 小時之後以含有 0.05% tween 20 的 PBS 溶液沖洗 3 次，再以 PBS 溶液沖洗 1 次以去除泡沫後移除 PBS 溶液，最後加入 100  $\mu$ L 的呈色劑 (disodium *p*-nitrophenyl phosphate as substrate) 反應 8~10 分鐘，利用 microplate reader (波長 405 nm) 進行吸光值測量。

#### VIII. 抑菌測試

分別取 2 mL 特異性 IgY 及非特異性 IgY 與同體積之源自民間豬場下痢仔豬腸道分離的大腸桿菌菌液混合，於 37°C 搖晃培養，將培養時間設計為 0、2、4 及 6 小時，再以各個時間點之培養樣品，用 TSB 瓊膠培養基於 37°C，12 小時，再計算每個培養盤之菌落數，以確認是否特異性 IgY 具有抑菌作用。

#### IX. 統計分析

試驗所得之資料以 SAS 系統分析各組間的變異，再以鄧肯氏多次變域測試 (Duncan's New Multiple Ranges Test) 比較各組間之差異顯著性 (SAS, 1996)。

## 結果與討論

IgY 是從鳥類 (包括家禽) 血液中的 IgG 運輸到蛋中並累積在蛋黃，這個過程作用就如同在哺乳動物胎盤的 IgG 轉移目的一樣，提供胎盤內的嬰兒被動免疫，使其有基本的防衛系統 (Klemperer, 1893)。因此，如同目前生產抗體的實驗動物一樣，當給予家禽特定抗原感染時，可產生特異性抗體儲存於蛋黃中 (Leslie *et al.*, 1969)。本研究是以市售的四合一疫苗 (含豬大腸桿菌 k88、k99、987P、F41 四種纖毛，CM) 及源自民間豬場分離引起仔豬下痢的大腸桿菌株 (AF) 為抗原，免疫白色來亨蛋雞及龍門蛋雞。實驗結果顯示，白色來亨蛋雞在 CM 抗原組總 IgY 之含量平均為 4.09 mg/mL WSF，AF 組總 IgY 之含量平均為 4.28 mg/mL WSF。龍門蛋雞在 CM 抗原組總 IgY 之含量平均為 5.33 mg/mL WSF，AF 組總 IgY 之含量平均為 4.68 mg/mL WSF (圖 1 與圖 2)。Sunwoo *et al.* (2002) 利用大腸桿菌 O157:H7 菌株為抗原，進行產蛋雞的免疫注射，藉以生產抗大腸桿菌 O157:H7 的專一性 IgY 抗體報告指出，在蛋黃中總 IgY 的含量為 12.58 mg/mL WSF，其結果與本試驗測得之總 IgY 含量 (4~5 mg/mL WSF) 相比高出許多。然而，在許多有關蛋黃中總 IgY 的含量分析文獻指出，蛋黃中總 IgY 的含量因分離方法及分析方法不同而有所差異 (1~25 mg/mL WSF) (Rose *et al.*, 1974; Shimizu *et al.*, 1988; Li-chan *et al.*, 1998)。

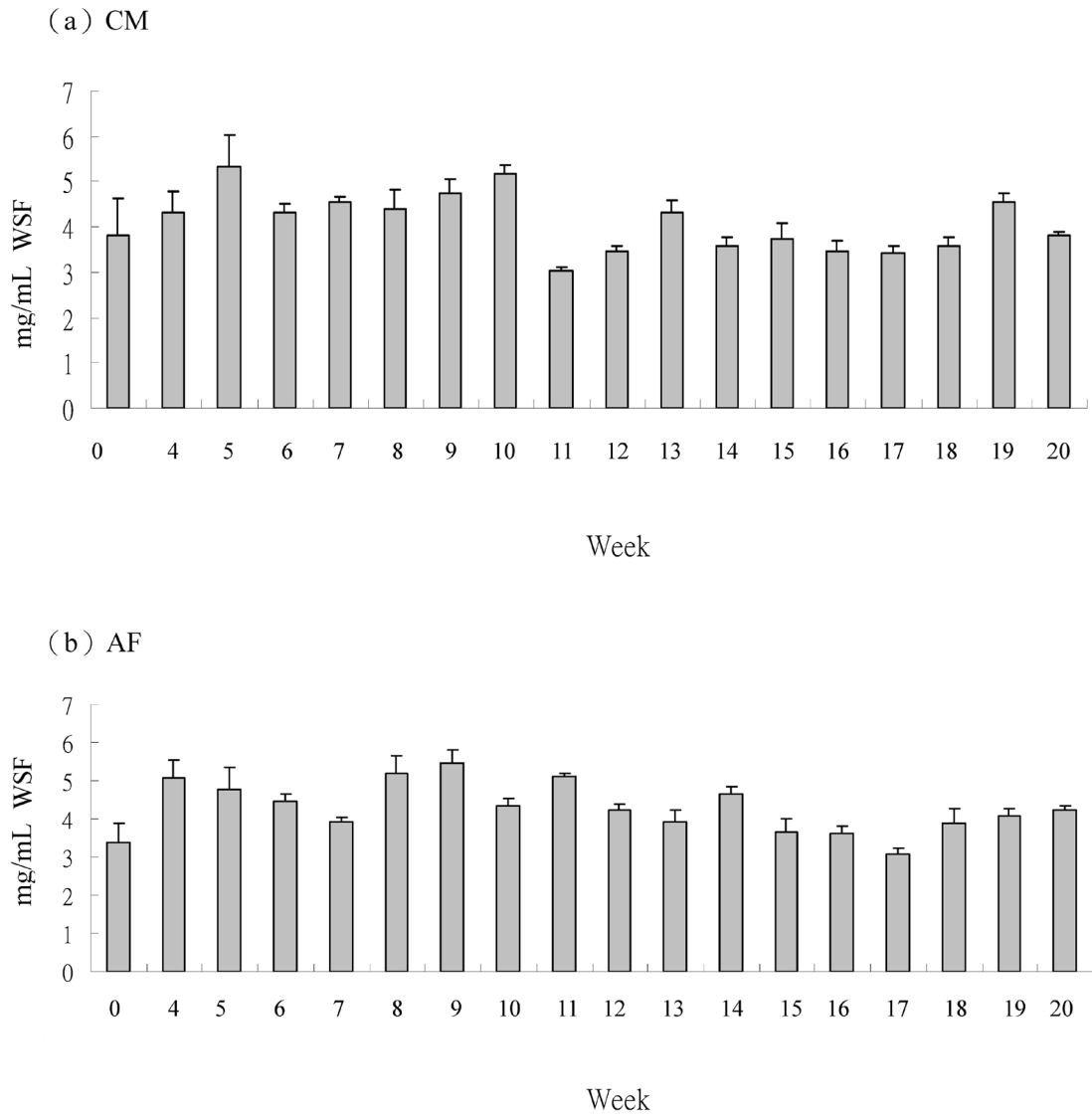


圖 1. 來亨蛋雞經 CM 和 AF 兩種不同抗原免疫注射後 0~20 週之蛋黃中總 IgY 含量 (mg/mL WSF)。

Fig. 1. The concentration of total IgY content of White Leghorn chickens in (mg/mL WSF) 0-20 weeks post immunization with CM and AF antigen. (a) CM ; (b) A F.

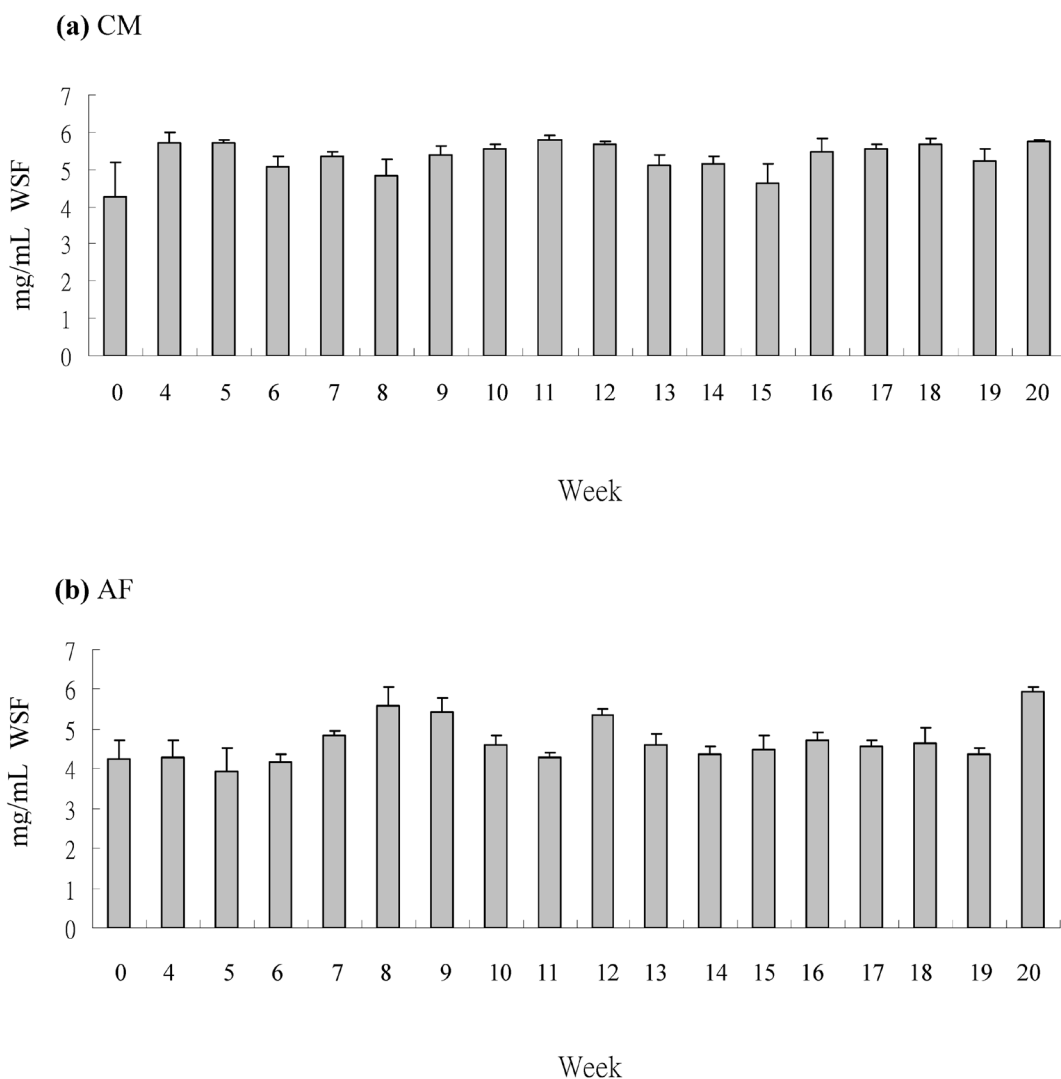


圖 2. 龍門蛋雞經 CM 和 AF 兩種不同抗原免疫注射後 0~20 週之蛋黃中總 IgY 含量 (mg/ml WSF)。

Fig. 2. The concentration of total IgY content of Lohmann chickens (mg/mL WSF) in 0-20 weeks post immunization with CM and AF antigen. (a) CM (b) A F.

Kariyawasam *et al.* (2004) 利用四株不同種的大腸桿菌 (*FimH*、*IutA*、*PapG* 和 *LPS*) 為抗原來免疫雞隻，指出雞隻血清中 IgY 的濃度在每間隔一週免疫一次，於第三次免疫後，血清中 IgY 的濃度逐漸上升，在第四週時血清中 IgY 的濃度會顯著增加達到高峰，並且會持續到第五週後才開始下降，在本研究中來亨雞血清中專一性 IgY 含量變化，亦觀察到類似的結果（圖 3），來亨雞和龍門有色蛋雞之血清中專一性 IgY 含量變化，依免疫刺激之週數（0、2、6、12 及 16 週），其 IgY 含量約在抗原刺激 2 週後會上升，在第四週會出現第一個高峰，其中來航蛋雞伴隨著每次抗原施打後即有上升之變化，且抗體力價達 1,000~2,500  $\mu$ g/mL。龍門有色蛋雞則於 0~14 週皆無明顯

之升高趨勢，只有 CM 組於 16 週後有上升趨勢且抗體力價達 1,500  $\mu\text{g/mL}$ 。顯示來航雞對於抗原之免疫刺激較龍門有色蛋雞敏感。在相關文獻亦有提到不同母雞對於抗原免疫後的免疫反應及所產生的特異性抗體含量會有差異 (Amaral *et al.*, 2002; Kitaguchi *et al.*, 2008)。另外，抗原使用的部分也是影響家禽免疫效果的重大因素，在以 *Staphylococcus*、*Salmonella*、*E. coli* 等細菌類抗原，發現用不同的膜外蛋白 (outer membrane protein) 或纖毛蛋白 (fimbrial adhesions) 進行家禽免疫後，所產生的特異性抗體含量有高低之差別 (Yokoyama *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2002)，而龍門有色蛋雞之 CM 組於 16 週後才逐漸上升，推論可能龍門有色蛋雞對於抗原之反應時間較晚，加上 AF 抗原是由民間農場純化出之大腸桿菌，其免疫性可能較弱，因此對雞隻之刺激較無明顯變化。

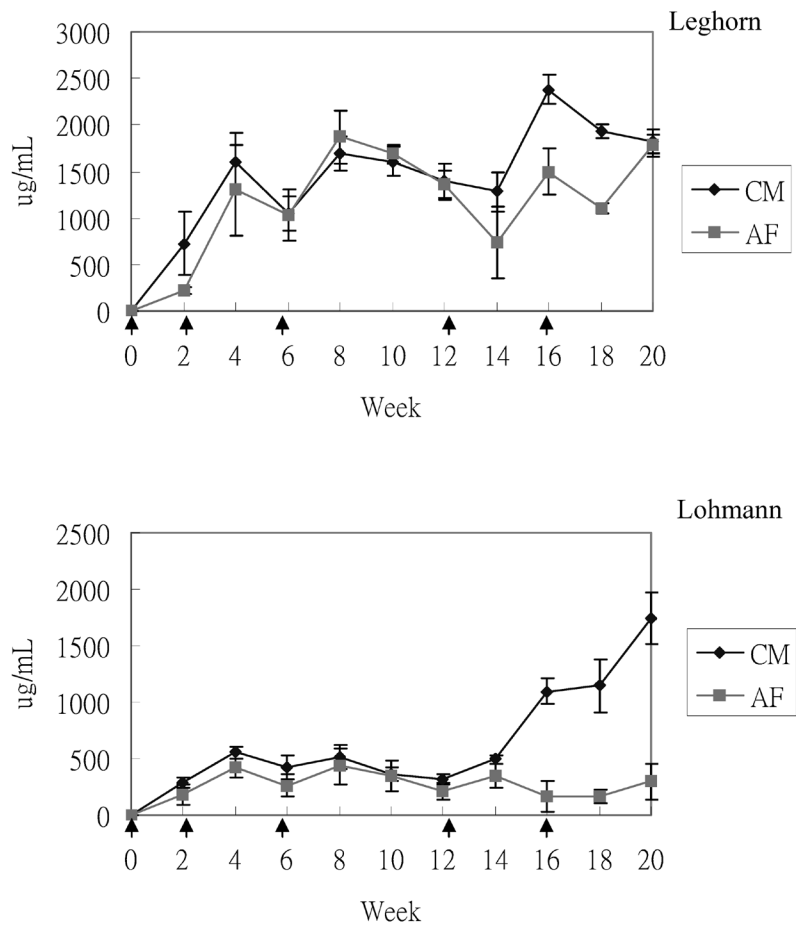


圖 3. 來亨蛋雞和龍門蛋雞經 CM 和 AF 兩種不同抗原免疫注射後，0~20 週之血清中專一性 IgY 含量 ( $\mu\text{g/mL}$  serum)。

↑：表示抗原免疫時間。

Fig. 3. The serum specific IgY concentration ( $\mu\text{g/mL}$  serum) of White Leghorn and Lohmann chickens in 0-20 weeks after immunization with CM and AF antigen.

↑：Time of antigen immunization.



在上述血清中專一性抗體分析的結果，是在第四週會出現第一個高峰；因此，在本研究中來亨蛋雞與龍門蛋雞免疫蛋的抗體分析是從抗原免疫注射後第 4 週開始直到第 20 週結束，蛋黃中專一性 IgY 抗體的含量變化如圖四所示，在來亨蛋雞蛋黃中專一性 IgY 抗體的含量變化與血清中專一性 IgY 抗體的含量變化，呈現類似的變化曲線，在每次補強免疫 14 天後抗體力價明顯上升，約在第 21 天左右抗體力價達到最高，然後再下降。

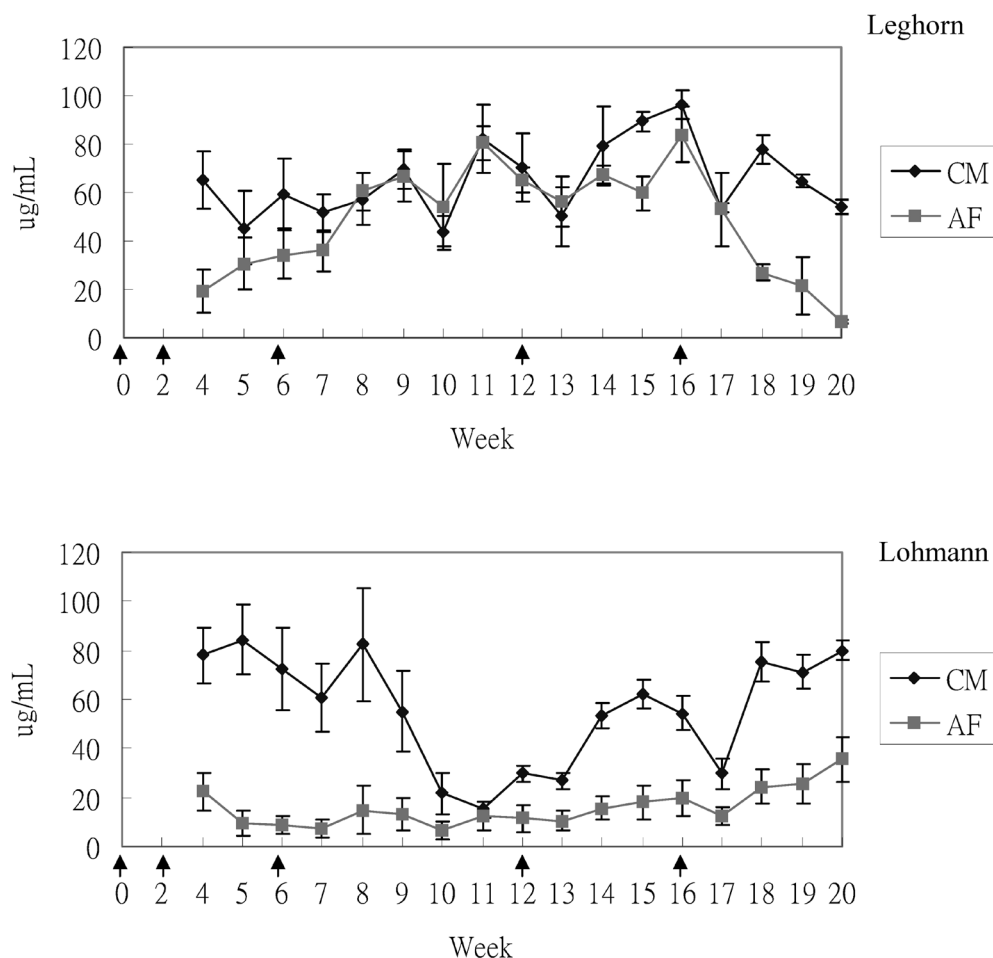


圖 4. 來亨蛋雞和龍門蛋雞經 AF 和 CM 兩種不同抗原免疫注射後，4~20 週之蛋中專一性 IgY 含量( $\mu\text{g}/\text{mL WSF}$ )。

↑：表示抗原免疫時間。

Fig. 4. The production of anti-*E. coli* IgY ( $\mu\text{g}/\text{mL WSF}$ ) of White Leghorn and Lohmann chickens immunization with CM and AF antigen, value was represented as the average of the eggs collected from 3 chickens in each week from 4-20 weeks after immunization.

↑：Time of antigen immunization.



來亨蛋雞在整個免疫期間於第 9 週、第 11 週和第 16 週出現三個高峰，其中是以第 16 週呈現最高量，其蛋黃中所含 CM 及 AF 的專一性 IgY 抗體的含量，分別為  $96.28 \mu\text{g/mL}$  和  $84.05 \mu\text{g/mL}$ 。在龍門蛋雞免疫過程中，也是呈現在每次補強免疫 14 天後抗體力價有上升現象，但是整個免疫期間的曲線變化與來亨雞的情形不同。觀察龍門蛋雞血清中專一性 IgY 抗體含量的變化曲線與其在蛋黃中專一性 IgY 抗體變化是呈現相同的變化情形；蛋黃中 IgY 含量是隨著血清中 IgY 含量的升高，蛋黃中 IgY 也會上升，但在以 AF 抗原免疫後的專一性 IgY 抗體含量在整個免疫期間均是呈現低含量 ( $<20 \mu\text{g/mL}$ )。Yokoyama *et al.* (1992) 利用 enterotovigenic *E. coli* 為抗原免疫雞隻來生產抗 *E. coli* IgY 抗體，報告指出抗體的含量的也是在抗原注射後 2 個星期後明顯上升，然後在 3~4 個星期後抗體開始下降。但是 Marquardt *et al.* (1999) 利用 *E. coli* K88 為抗原進行雞隻免疫，IgY 抗體的變化則是與本研究的結果相同。

雞隻免疫後專一性 IgY 的產量如圖 5 所示，在來亨雞平均每個蛋所含 CM 及 AF 的專一性 IgY 抗體的含量分別為  $65.28$  和  $48.31 \mu\text{g/mL}$ ；另外，在龍門蛋雞則分別為  $55.78$  和  $14.4 \mu\text{g/mL}$ 。在相同的抗原免疫後來亨雞與龍門蛋雞呈現出不同的免疫反應，這可能與不同品種間其遺傳背景的差異有關 (Kitaguchi *et al.*, 2008)。在家禽的免疫反應除了品種間的差異外，抗原的種類和型式亦有很大影響，不同的抗原有其不同的抗原決定位 (epitope)，因此引起的免疫反應也不同 (Yokoyama *et al.*, 1992)。目前研究顯示，以完整細菌或病毒取代部分病原菌蛋白為抗原所產生的特異性抗體含量會較佳，抗體實際在活體內中和病毒的效果也是最好的 (Le Claire *et al.*, 2002)。

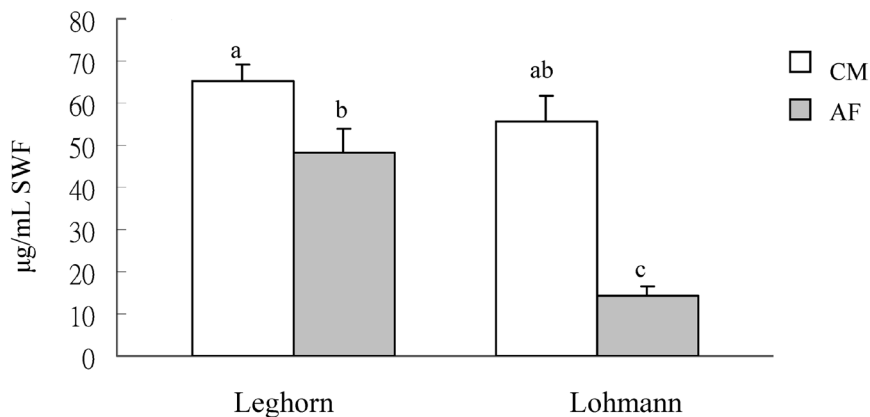


圖 5. 來亨蛋雞和龍門蛋雞經 AF 和 CM 兩種不同抗原免疫注射後 4~20 週平均每個免疫蛋之專一性 IgY 含量 ( $\mu\text{g/mL SWF}$ )。

Fig. 5. The average anti-*E. coli* IgY content ( $\mu\text{g/mL SWF}$ ) in eggs collected from White Leghorn and Lohmann chickens 4-20 weeks after immunization with CM and AF antigen. <sup>ab</sup> Values in the column with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

為確認 anti-*E. coli* IgY 是否具有抑制 *E. coli* 生長的效果，本研究是以 *E. coli* 和 anti-*E. coli* IgY 專一性抗體共培養進行抑菌測試，分別取免疫後第 9 週和第 13 週所生產的 anti-*E. coli* IgY 專一性抗體進行抑菌測試，在免疫後第 9 週的所收集的免疫蛋其 CM 專一性 IgY 抗體含量在來亨雞

與龍門蛋雞分別為  $67.15 \mu\text{g/mL}$  和  $63.12 \mu\text{g/mL}$ ，AF 專一性 IgY 抗體含量分別為  $44.08 \mu\text{g/mL}$  和  $18.27 \mu\text{g/mL}$ 。和第 13 週所收集的免疫蛋其 CM 專一性 IgY 抗體含量在來亨雞與龍門蛋雞分別為  $50.96 \mu\text{g/mL}$  和  $43.65 \mu\text{g/mL}$ ，AF 專一性 IgY 抗體含量分別為  $46.16 \mu\text{g/mL}$  和  $10.3 \mu\text{g/mL}$ 。在 *E. coli* 與 anti-*E. coli* IgY 的共培養測試結果如表 1 和表 2 所示。在以第 9 週所生產的 CM 與 AF 專一性抗體進行隔夜共培養測試結果，計算其菌落數 (colonies) 在來亨雞分別是 CM 組為  $82 \pm 2$ 、AF 組為  $107 \pm 38$  和對照組為  $111 \pm 47$ ，在龍門蛋雞則分別是 CM 組為  $78 \pm 7$ 、AF 組為  $114 \pm 15$  和對照組為  $112 \pm 11$ 。

表 1. 來亨雞和龍門蛋雞經 AF 和 CM 兩種不同抗原免疫注射後，第 9 週生產之專一性 IgY 對 *E. coli* 之抑菌測試

Table 1. The *E. coli* inhibitory effects of the anti-*E. coli* IgY produced from White Leghorn and Lohmann chickens at 9 th week after immunization with CM and AF antigen

Breed	Number of <i>E. coli</i> colonies formed after co-culture with IgY of antigen			P value		
	CM	AF	Control	Breed	Antigen	Breed×antigen
Leghorn chicken	$82 \pm 21.6^b$	$107 \pm 38.7^a$	$111 \pm 47.8^a$	0.8152	<0.0001	0.5659
Lohmann chicken	$78 \pm 7.5^b$	$114 \pm 15.3^a$	$112 \pm 11.9^a$			

Means  $\pm$  SE (n=6).

<sup>ab</sup> Values in the same row with different superscripts are different ( $P < 0.05$ ).

表 2. 來亨雞和龍門蛋雞經 AF 和 CM 兩種不同抗原免疫注射後，第 13 週所生產隻專一性 IgY 的抑菌測試

Table 2. The *E. coli* inhibitory effects of the anti-*E. coli* IgY produced from White Leghorn and Lohmann chickens at 13th week after immunization with antigen of commercial four-in-one *E. coli* vaccine (CM) and inactivated *E. coli* from a local farm (AF)

Breed	Number of <i>E. coli</i> colonies formed after co-culture with IgY of antigen			P value		
	CM	AF	Control	Breed	Antigen	Breed×Antigen
Leghorn chicken	$89 \pm 19^b$	$126 \pm 42^a$	$113 \pm 28^{ab}$	0.575	0.0007	0.847
Lohmann chicken	$98 \pm 7^{ab}$	$133 \pm 15^a$	$110 \pm 18^{ab}$			

Means  $\pm$  SE (n=6).

<sup>ab</sup> Values in the same row with different superscripts are different ( $P < 0.05$ ).

另外，以 13 週所生產的 CM 與 AF 專一性抗體進行共培養測試結果，計算其菌落數在來亨雞分別是 CM 組為  $89 \pm 19$ 、AF 組為  $126 \pm 42$  和對照組為  $113 \pm 28$ ，在龍門蛋雞則分別是 CM 組為  $98 \pm 7$ 、AF 組為  $133 \pm 15$  和對照組為  $110 \pm 18$ 。在第 9 週專一性 IgY 抗體對 *E. coli* 的生長抑制效果，來亨雞與龍門蛋雞之 CM 組與對照組相比有顯著抑制大腸桿菌生長的效果。但 AF 組則

無顯著抑制效用，顯示抗原的不同影響抗體之抑菌作用結果 ( $P < 0.001$ )。Sunwoo *et al.* (2002) 利用 45  $\mu\text{g/mL}$ 、90  $\mu\text{g/mL}$  和 180  $\mu\text{g/mL}$  的抗 *E. coli* O157:H7 菌株專一性 IgY 對 *E. coli* O157:H7 菌株進行抑菌試驗結果顯示專一性 IgY 抗體只要達 90  $\mu\text{g/mL}$  以上就有顯著的抑菌效果，而在本報告結果顯示 CM 的專一性 IgY 抗體只要達 63.12  $\mu\text{g/mL}$  以上就有顯著的抑菌效果。在抑菌測試中，結果顯示在 *in vitro* 試驗中抗大腸桿菌 IgY 對大腸桿菌生長具有抑制的效果。因此，利用引起仔豬下痢的大腸桿菌所生產抗大腸桿菌 IgY，是具有防治仔豬因大腸桿菌而引起下痢疾病的潛能。

Yokoyama *et al.* (1992)，利用給予新生仔豬不同抗體力價之抗 K88、K99 與 987P 三種大腸桿菌 IgY 抗體進行試驗，結果顯示投與 625 及 2,500 力價之組別，可有效清除仔豬腸道中之病原性大腸桿菌，且顯著降低下痢發生率。Owusu-Asiedu *et al.* (2002) 利用乾燥豬血漿粉及動物血漿粉，搭配含有 F18 及 K88 兩種大腸桿菌抗體的 IgY 蛋黃粉，餵給以 F18 及 K88 兩種大腸桿菌攻毒後之豬隻服用，以觀察抗大腸桿菌 IgY 的蛋黃粉，對於因大腸桿菌感染引起下痢的豬隻，是否具有治療效果。試驗結果顯示，有給予抗大腸桿菌 IgY 的蛋黃粉的試驗組，在下痢情形及糞便中大腸桿菌數量均較對照組明顯降低；且於 *in vitro* 的結果，也顯示試驗組較對照組更具有抑制大腸桿菌增生的效果。另 Owusu-Asiedu *et al.* (2002) 利用植物性蛋白添加抗大腸桿菌抗體蛋黃粉，對於哺乳仔豬進行大腸桿菌攻毒試驗的保護效果。結果顯示，本身沒有任何大腸桿菌抗體力價反應的植物性蛋白，在添加抗體蛋黃粉後，可降低仔豬下痢發生率及死亡率。同年 Owusu-Asiedu 等人將其試驗加入抗生素組作為對照，結果發現不論是乾燥豬血漿粉組或植物蛋白組，在添加抗體蛋黃粉後，對於仔豬下痢情形、腸道菌數分析和死亡率的影響，均與抗生素組有相同之效果；由以上結果顯示，含有抗大腸桿菌抗體的蛋黃粉應具有取代抗生素之潛力。

## 參考文獻

- Akita, E. M. and S. Nakai. 1992. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *J. Food Sci.* 57:629-634.
- Akita, E. M. and S. Nakai. 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* 60:207-214.
- Amaral, J. A., D. E. Tino, M. Franco, M. M. S. Carneiro-Sampaio and S. B. Carbonare. 2002. Anti-enteropathogenic *Escherichia coli* immunoglobulin Y isolated from eggs laid by immunized leghorn chickens. *Res. Vet. Sci.* 72:229-234.
- Gassmann, M., P. Thommes, T. Weiser and U. Hübscher. 1990. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *Faseb J.* 4(8): 2528-32.
- Ikemori, Y., M. Ohta, K. Umeda, F. C. J. Icatlo, M. Kuroki, H. Yokoyama and Y. Kodama. 1997. Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder. *Vet. Microbiol.* 58(2-4):105-111.
- Kariyawasam, S., B. N. Wilkie and C. L. Gyles. 2004. Resistance of broiler chickens to *Escherichia coli* respiratory tract infection induced by passively transferred egg-yolk antibodies. *Vet. Microbiol.* 98:273-284.
- Kitaguchi, K., K. Osada, F. Horio and A. Murai. 2008. Exclusion of polymeric immunoglobulins and selective IgY transport that recognizes its Fc region in avian ovarian follicles. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 121: 290-299.

- Klemperer, F. 1893. XV. Ueber naturliche Immunitat und ihre Verwerthung fur die Immunisirungstherapie. In Archiv fur Experimentelle Pathologie und Pharmakologie. Naunyn, B. and Schmiedeberg, O., eds. Verlag von F. C. W. Vogel, Leipzig, Einunddreissiger Band.
- Lee, E. N., H. H. Sunwoo, K. Menninen and J. S. Sim. 2002. In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. Poult. Sci. 81:632-641.
- LeClaire, R. D., R. E. Hunt and S. Bavari. 2002. Protection against bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B by passive vaccination. Infect. Immunol. 70(5):2278-2281.
- Leslie, G. A. and L. W. Clem. 1969. Phylogen of immunoglobulin structure and function. Immunoglobulins of the chicken. J. Exp. Med. 130(6):1337-1352.
- Li-Chan, E. C. Y., S. S. Ler, A. Kummer and E. M. Akita. 1998. Isolation of lactoferrin by immunoaffinity chromatography using yolk antibodies. J. Food Biochem. 22:179-195.
- Marquardt, R. R., L. Z. Jin, J. W. Kim, L. Fang and A. A. Frohlich. 1999. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 23(4):283-288.
- Owusu-Asiedu, A., S. K. Baidoo, C. M. Nyachoti and R. R. Marquardt. 2002. Response of early-weaned pigs to spary-dried porcine or animal plasma-base diets supplemented with egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli*. J. Anim. Sci. 80: 2895-2903.
- Polson, A. and M. B. Von Wechmar. 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. Immunol. Commun. 9:476-493.
- Rose, M. E., E. Orlans and N. Buttress. 1974. Immunoglobulin classes in the hen's egg their segregation in yolk & white. Eur. J. Immunol. 4: 521-523.
- SAS. 1996. SAS/STAT User's Guide, Release 6.11 Ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Sarker, S. A., T. H. Casswall, L. R. Juneja, E. Hoq, I. Hossain, G. J. Fuchs and L. Hammarström. 2001. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 32(1): 19-25.
- Shimizu, M., R. C. Fitzsimmons and S. Nakai. 1988. Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. J. Food Sci. 53: 1360-1366.
- Schade, R., W. Burger, T. Schöneberg, A. Schniering, C. Schwarzkopf, A. Hlinak and H. Kobilk. 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(2): 75-84.
- Sunwoo, H. H., E. N. Lee, K. Menninen, M. R. Suresh and J. S. Sim. 2002. Growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on O157:H7. J. Food Sci. 67: 1486-1494.
- Sun, S., W. Mo, Y. Ji and S. Liu. 2001. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. Rapid Commun. Mass Spectrom. 15(9): 708-12.
- Yokayama, H., R. C. Peralta, R. Diaz, S. Sendo and Y. Ikemori. 1992. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. Infect. Immunol. 60: 998-1007.
- Yokoyama, H., K. Umeda, R. C. Peralta, T. Hashi, F. C. J. Icatlo, M. Kuroki, Y. Ikemori and Y. Kodama. 1998. Oral passive immunization against experimental salmonellosis in mice using chicken egg yolk antibodies specific for *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium*. Vaccine 16(4): 388-393.

# Production of egg yolk immunoglobulin against *Escherichia coli* from white Leghorn and Lohmann layer<sup>(1)</sup>

Jenn-Fa Liou<sup>(2)(5)</sup> Yi-Fan Lin<sup>(3)</sup> Tu-Fa Lien<sup>(3)</sup> Jen-Wen Shiau<sup>(2)</sup>  
Jui-Jane Tailiu<sup>(2)</sup> Chein Tai<sup>(4)</sup> and Lih-Ren Chen<sup>(2)(4)(5)(6)</sup>

Received : Nov. 13, 2009 ; Accepted : Jan. 22, 2010

## Abstract

The objective of this study was to investigate the immunization response to *Escherichia coli* (*E. Coli*) antigen in different breeds of layer and the function of specific immunoglobulin in yolk (IgY) produced. The antibodies were raised by intramuscular immunization to white Leghorn and Lohmann layer with inactivated *E. coli* antigen either from the commercial vaccine (CM) or isolated from a local farm (AF). Anti-*E. coli* IgY antibodies were isolated by using water dilution method and their *E. coli* inhibitory effective were then determined. The anti-*E. coli* IgY production of white Leghorn /Lohmann layer immunized with the CM and AF antigens were 65.28/55.78  $\mu$ g/mL water soluble fraction (WSF) and 48.31/14.4  $\mu$ g/mL WSF, respectively. The specific IgY from white Leghorn layer immunized with CM antigen had a superior inhibitory effect on growth of activate *E. coli* than others. The least effective concentration to inhibit growth of activate *E. coli* for this specific IgY was 63  $\mu$ g/mL WSF.

Key words : IgY, *E. Coli*, Chicken.

---

(1) Contribution No.1549 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Physiology Division, Livestock Research Institute, COA-LRI, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.

(3) Department of Animal Science, National Chiayi University, Chia-Yi 600, Taiwan, R.O.C.

(4) Southern Taiwan University, Tainan 710, Taiwan, R.O.C.

(5) Institute of Biotechnology, National Chung Kung University, Tainan 701, Taiwan, R.O.C.

(6) Corresponding author, E-mail: lrchen@mail.tlri.gov.tw

