

# 닭血清에 의한 緬羊赤血球의 溶血에 관한 研究

徐 钊 淮

서울大學校 農科大學 獸醫學科

## 緒 論

닭의 血清으로 構成되는 抗體와 이에 特異的인 抗原과의 結合物은 기니피補體를 結合하기 위해서 닭의 补體中 C1과 C4成分을 必要로 한다<sup>17)</sup>. 기니피補體에 닭補體成分을 첨가함으로써 抗原 抗體結合物을 檢出하는 이 补體結合反應을 改良補體結合反應이라 하여 오늘날 몇몇 닭 바이러스 抗體抗原系에 適用하고 있다. 그러나 이 改良補體結合反應은 닭補體成分을 첨가하는 번거로움을 지니고 있고 이와 같은 번거로움을 줄이기 위하여 닭補體와 緬羊赤血球 및 抗緬羊赤血球家兔血清으로 構成되는 溶血系에 의한 补體結合反應을 試圖하면 닭血清이 緬羊赤血球를 溶血하게 된다.

사람과 家兔의 抗血清을 除外한 여러 가지 動物의 抗血清은 기니피의 补體가 없이도 溶血系의 한 構成因子인 緬羊赤血球를 溶血케 한다.<sup>24)</sup> 이와 같은 溶血現象은 豚血清, 牛血清, 緬羊血清 그리고 鴨血清에서 볼 수 있다. 따라서 이와 같은 動物의 抗體系에 대한 特異抗原의 結合物은 直接補體結合反應으로 檢出이 不可能하며 특히 抗原이 바이러스여서 抗體抗原結合物의 力價가 약할 경우 더욱 檢出이 不可能하다. 그래서 이 研究에서는 닭血清에 의한 緬羊赤血球의 溶血現象을 究明하여 보다 便利한 补體結合反應이 착출되도록 試圖한 것이 이 研究를 遂行한 目的의 하나이다. 그러기 위해서 닭血清을 补體分劃法에 의거하여 分劃한 다음 각 分割의 溶血性을 調査하였다.

赤血球의 溶血은 크게 나누어 세가지 類型으로 区分할 수 있다. 하나는 免疫溶血이고 다른 하나는 化學物에 의한 溶血이고 또 다른 하나는 物理的인 要因에 의한 溶血 類型等이다. 免疫溶血이란 赤血球 表面에 抗體가 結合하고 抗原(赤血球表面) 抗體結合物에 补體가 結合해서 이루어지는 溶血이다<sup>5, 6, 8, 15, 24, 31)</sup>. 이 類型의 特徵은 赤血球 表面에 圓形의 溶血孔을 만드는 것과 溶血孔의 數와 크기는 抗體分子의 數와 函数의 要因에 있는 점이다. 化學物에 의한 溶血은 赤血球膜을 구성하는 物質을 選擇的으로 破壞하여 溶血하는 것이며 溶血性物質

에 따라 固有의 溶血孔을 만드는 것이 특징이다. 끝으로 物理的인 要因으로는 等張性的 差異에 비롯된 破壞로 인한 溶血을 들수 있는데 이것은 溶血孔을 形成치 않고 一時의 폭발적인 破壞로 인한 溶血을 일으키는 것이 특징으로 되어 있다. 이 研究의 두번째 目的是 닭血清에 의한 緬羊赤血球의 溶血이 위에 적은 세 가지 溶血 類型中 어느 것에 속하는 것인가를 밝히는데 있다. 그러기 위해서 닭血清에 感作된 緬羊赤血球를 다른 對照群과 더불어 電子顯微鏡<sup>33)</sup>으로 比較 觀察하였다.

以上과 같은 두가지 研究 目的是 即 첫째는 改良補體結合反應의 技術的인 문제의 解決을 위한 것과 둘째로는 免疫溶血의 本態를 究明하기 위하여 다음과 같은 基本的인 實驗을 하였다. 즉 닭血清源인 닭 個體別, 年齡別 및 性別에 의한 溶血現象의 變動과 溶血機轉을 밝히기 위해서 反應系의 最適溫度, 最適 pH, 陽イ온의 影響等을 實驗하였다.

## 材料 및 方法

이 實驗에 使用된 蒸溜水는 이온交換樹脂로 이온(NaCl based)이 20 ppm 이하로 除去된 것을 사용하였다.

유리器具는 中性洗劑에 담구었다가 水道물로 깨끗이 씻은 뒤에 또 증유수에 담구었다가 다시 증유수로 부셔서 乾燥시켜 사용하였다. 또 實驗에 사용된 솜으로 막은 파이펫, 시험관 그리고 採血에 사용된 注射器, 注射針도 乾熱滅菌器에 넣어 250°C에서 3시간 동안 滅菌하여 사용하였다.

그리고 特別히 지적하지 않는 實驗에 한해서 다음과 같은 材料와 方法을 이 研究에 適用하였다.

**Veronal-NaCl緩衝液<sup>25)</sup>:** 닭血清을 비롯한 緬羊赤血球 洗滌에는 0.005 M veronal-NaCl緩衝液을 使用하였다. 이 溶液은 0.145 M의 sodium chloride와 0.005

M의 veronal-buffer로 되어있으며 pH는 7.2±0.1로서 0.0005 M의 Mg<sup>2+</sup>(MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O)와 0.00015 M의 Ca<sup>2+</sup>(CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O)이 들어있게 만들었다. veronal-NaCl緩衝液의 組成은 다음과 같다.

sodium chloride.....	84.75 g
5,5-diethyl barbituric acid.....	5.75 g
sodium 5,5-diethylbarbiturate .....	3.75 g
calcium chloride, dihydrate.....	0.22 g
magnesium chloride, hexahydrate.....	1.02 g

Barbital 만은 500 ml의 더운 물(70°C 정도)에 녹이고 다른 成分은 남아지 물에 가한 다음 25°C 정도에서 冷却한 後 再蒸溜水로 全體 溶液이 2,000 ml.가 되도록 만 들어서 緩衝液 原液으로 삼았다. 이것을 2°C 冷藏庫에 保管하면서 사용하였다. veronal-NaCl 緩衝液은 緩衝液 原液 1에 대해서 冷却된 증유수 4를 가하여 만들었다. 緩衝液의 原液은 2°C 冷藏庫에서 2個月동안은 使用可能하나 稀釋된 것은 하루안에 사용하였다.

**綿羊赤血球**: 採血한 綿羊血液의 凝固防止 및 貯藏目的으로 改良 Alsever 溶液을 使用하였다<sup>11)</sup>. 改良 Alsever 溶液의 組成은 다음과 같다.

glucose .....	2.05 g
sodium citrate .....	0.89 g
sodium chloride .....	0.42 g

이것을 100 ml가 되도록 증유수에 溶解하고 50 ml溶量의 병에 15 ml씩 分注한 다음 121°C에서 15分間 高壓滅菌해서 즉시 冷却시켜 2°C에 保管하면서 使用하였다. 採血할 때는 50 ml容量의 注射器로 溶液 15 ml.를 吸取한 다음 거기에 同量의 綿羊血液을 無菌的으로 頸靜脈으로 부터 採血하여 잘 혼들어서 병에 注入하였다. 그리고 이것을 2°C에 保管하면서 溶血이 일어나지 않고 上層이 混濁되지 않는 것을 플라서 사용하였다.

綿羊赤血球液은 veronal-NaCl 緩衝液으로 1000 rpm에서 3回以上 洗滌하고 1% 浮游液이 되게 만들어 사용하였다. 이 稀釋 赤血球液은 하루안에 사용하였다.

**닭血清**: 鸽의 血清은 서울에 있는 鸽市場과 水原에 있는 屢鷄場에서 얻은 血液에서 分離하여 사용하였다. 血液은 鸽의 脖에서 放血되는 것을 가급적 無菌的으로 滅菌된 병에 받아 담고 마개를 한 다음 휴대용 冷藏箱에

子에 담아서 運搬하였다. 採血後 3~6時間 以內에 各個體別로 血清을 分離하여 一部는 -60°C에 끈 冷凍保存하고 남아지는 3時間 以內에 個體別 血清의 溶血價를 測定하는데 使用하였다.

**溶血反應**: 鸽血清을 veronal-NaCl 緩衝液으로 原液, 2倍, 4倍, 8倍, 16倍 그리고 32倍까지 2倍數 稀釋하였다. 鸽血清의 各稀釋液 0.2 ml와 1%의 綿羊赤血球液 0.2 ml.를 混合하고 잘 혼들어서 46°C의 恒溫水槽에서 30分間 作用시키고 그 結果를 判定하였다. 그리고 鸽 血清의 稀釋方法와 稀釋된 血清과 綿羊赤血球의 混合의 順序와 量은 Table 1과 같다.

Table 1. Procedures of Hemolytic Reaction of Chicken Serum and Sheep Erythrocytes

No. of Test Tube	1	2	3	4	5	6
Reciprocal of Serum Dilution	0	2	4	8	16	32
Veronal-Buffer(ml.)	0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Chicken Serum(ml.)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Sheep RBC(1%)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

溶血의 程度는 肉眼의인 것과 分光光電計에 의한 方法으로 判定하였는데 肉眼의인 方法은 溶血價를 測定하는데 利用하였다. 完全溶血을 일으킨 狀態를 0으로 삼고, 75%정도의 溶血을 1, 50%의 溶血을 2, 25%의 溶血을 3, 溶血이 전혀 일어나지 않은 것을 4로 表示하였다. 그리고 完全溶血을 보여주는 血清의 稀釋倍數를 그 血清의 溶血價로 삼았다. Coleman junior 分光光電計를 利用하였을 때는 最高吸收波長을 500 nm 으로 하였다.

**닭血清의 溶血性 成分의 分析**: 綿羊의 赤血球를 溶血하는 鸽 血清의 溶血性 成分이 易熱性 物質이라고는 하지마는 그 本態가 무엇인가를 알지 못하기 때문에 이것을 究明하기 위해 補體分析法<sup>25,3)</sup>을 適用하였다. 補體分析에는 稀釋法을 適用하여 C1, 3과 C2, 4로 나누었다. 이어서 zymosan 處理<sup>25,23)</sup>에 의한 補體의 C3을 吸着하고 그리고 암모니아水로 處理하여 C4를 破壊하는 順序로 實驗하였다<sup>25)</sup>. 끝으로 血清을 56°C에서 30分間 처리하는 加熱處理法도 아울러 適用하였다.

稀釋法은 冷却處理된 鸽血清(溶血價 1/16) 1.0 ml와 冷却處理된 0.03 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液 4.0 ml를 조심스

럽게 천천히 試驗管에서 混合하였다. 混合物은 0°C에서 20~30分間 靜置시킨 뒤에 冷室에서 遠心分離하여 上層液과沈澱物을 分離하였다. 沈澱物은 生理食鹽水 1.0 ml에 溶解하였다. 이것을 pH 6.8~7.0이 되도록 2 M NaHCO<sub>3</sub>로 調整하였다(M: C1, 3). 上層液(E)은 等張液이 되도록 10% NaCl溶液을 가하고 난 뒤에 다시 그것의 pH가 7.4가 되도록 하기 위해 2 M NaHCO<sub>3</sub>를 가였다(E:C2, 4). 이때 上層液의 pH가 6.5以下가 되지 않도록 하였다<sup>25)</sup>. 이상과 같은 과정을 거친 最終稀釋倍數 1/5인 分割을 溶血反應에 供試하였다.

C3의 吸着은 zymosan 吸着法을 이용하였다<sup>26, 28)</sup>. Zymosan 100 mg을 10 ml의 生理食鹽水에 넣고 90分間 齡였다. 그것을 遠心分離하여 上層液은 버리고沈澱物은 100 ml의 生理食鹽水에 浮游시켰다.

i) zymosan原液(1 mg/ml)은 冷藏庫에 保管하여 使用할 때에는 잘 혼들었다. 新鮮한 鼎血清(溶血價 1/16) 1 ml를 zymosan 2.70 mg(zymosan 浮游液 2.70 ml)을 사용하여 吸着하였다. 그러기 위하여 파이펫으로 zymosan 浮游液 2.70 ml를 취하여 시험관에 넣고 1500 rpm으로 20分間 遠心分離한 다음 上層液은 버리고沈澱物이 있는 시험관에 吸着코서하는 鼎血清 1.0 ml를 가하여 混合하였다. 이것을 37°C에서 1時間 자주 혼들면서 반응시킨 다음 다시 遠心에 걸어 1500 rpm으로 20分間 遠心分離하였다. 여기서 上層液(C1, 2, 4)은 다른 試驗管으로 옮기고 4 ml의 生理食鹽水를 上層液에 가하여 原血清에 대해 1/5의稀釋 血清 分割이 되도록 만들어 溶血反應에 供試하였다.

ii) 血清의 C4를 破壞시키기 위해 新鮮한 鼎血清(溶血價 1/16) 1.0 ml와 0.15 N NH<sub>4</sub>OH溶液 0.25 ml를 混合하였다. 이混合物을 室溫에서 90分동안 反應케 한 뒤에 다시 0.15 N HCl溶液 0.25 ml를混合物에 가하여 中和시켰다. 이것을 原血清에 대해 最終稀釋倍數가 1/5이 되게끔 生理食鹽水를 3.5 ml 가하였다 그리고 나서 溶血反應에 供試하였다.

C1과 C2의 破壞는 新鮮한 鼎血清(溶血價 1/16)을 56±0.1°C에서 20~30分間 處理하여 만들었다. 이와 같이 熱處理한 鼎血清을 生理食鹽水 4.0 ml와 混合하여 血清稀釋倍數가 1/5이 되게끔 만들고 이것을 溶血反應에 供試하였다.

電子顯微鏡法：細羊赤血球의 溶血에 따른 赤血球膜의 微細構造의 變化를 자세히 관찰하기 위하여 電子顯微鏡法을 쳐용하였다.

溶血反應操作은 앞에서의 方法과同一하게 하였으나 2倍數稀釋에서 1~2程度의 溶血狀態가 되거나 또는 肉眼的으로 完全溶血이 되면 veronal-NaCl緩衝液을 가하여 溶血이나 赤血球膜의 消失이 그이상 진행되지 않도록 하였다. 이것을 超遠心分離機를 利用하여 60,000 G에서 30分間 2回, 遠心洗滌하였다. 그 上層液은 버리고沈澱物은 0.5~1.0 ml의 veronal-NaCl緩衝液으로 浮游시켜 이것을 試料로 사용하였다. 한편 遠心洗滌하여 그 上層液은 버리고沈澱物 1.0~2.0 ml를 그대로 試料로 삼아 비교하였다.

iii) 電子顯微鏡 試料로 사용된 veronal-NaCl緩衝液, 細羊赤血球 그리고 닭의 血清은 使用하기에 앞서 遠心分離器에 걸어 3,000 rpm에서 30分間 遠心沈澱시켜 모든 不純物을 除去하였다.

Collodion支持膜：collodion膜은 被膜이 弱하기는 하지만 被膜形成의 過程이 간단하고 또 膜이 잘 形成되기 때문에 現在에도 低倍率 觀察用의 支持膜으로서 많이 利用되고 있다<sup>32)</sup>. 이러한 collodion膜을 만들기 위하여 먼저 petri dish(직경 15 cm 이상)에 35~40°C의 증유수를 절반정도 넣었다. 그리고 유리판등에 부친 mash를 그 물속에 넣어서 밑에서 1 cm 높이의 臺위에 두었다. 이렇게 한뒤에 collodion의 2% amyle acetate溶液을 파이펫으로 흡취하여水面中央에 1~2방울을 조용히 떨어트렸다. 이때 液은 빠르게水面위에 퍼지고 溶劑는 끈 撥發되고水面에는 얇은 collodion膜이 形成되는데 이때 이膜의 두께는 10~30 nm가 되었다. 이와같은 方法으로 mash에 collodion被膜을 불인 뒤에 炭素를 利用한 真空蒸着法<sup>32)</sup>으로 支持膜을 補強하여 사용하였다.

電子顯微鏡用 試料는 1) 新鮮한 細羊赤血球, 2) 新鮮한 鼎血清으로 處理된 細羊赤血球, 3) 溶血素 細羊赤血球에 기니피 補體를 가한 것, 4) 증유수를 가한 細羊赤血球 등의 네가지이다. 이것을 negative staining method<sup>9, 14)</sup>에 適用하였다. 그러기 위해서 veronal-NaCl緩衝液으로 2% potassium phosphotungstate(PTA, Kanto chemi. Co.)水溶液을 만들고 이것의 pH를 1N NaOH溶液으로 7.0으로 調整하여 사용하였다. 이溶液을 載物硝子 위에 마이크로 파이펫으로 한 방울 떨어 뜨리고 그 위에 準備해둔 試料를 한 방울 가하여 잘 混合한 다음 4~5分間 染色하였다. 이와 같이 染色된 赤血球液을 mash表面에 약간 附着시키고 風乾시켜서 그 mash를 電子顯微鏡으로 관찰하였다.

## 結果

**正常 雞血清의 細羊赤血球에 대한 溶血價의 個體別 分布:** 이 實驗에서는 각 個體別 血清이 떠우는 溶血價를 調査하였다. 總 血清例 344例의 溶血價의 分布는 Table 2에 적은바와 같다. 여기에서 溶血價 8을 나타내는 數가 가장 많은 103例로서 29.94%를 차지하였다. 또 溶血價 16을 表示한 것이 가장 적은 21例로서 6.13%였다. 그리고 溶血價가 2 以下인 것 76例(22.09%)중에는 75%의 溶血을 떠운 例가 4例(5.2%), 50%溶血된 例가 23例(30.3%), 25%溶血된 例가 25例(32.9%) 그리고 전혀 溶血되지 않은 例가 24例(31.5%)였다.

Table 2. Distribution of Hemolytic Titer of Normal Chicken Sera on Sheep Erythrocytes

Reciprocal of Hemolytic Titer	Number of Chicken	Percentage
<2	76	22.09
2	51	14.82
4	93	27.03
8	103	29.94
16	21	6.13
	344	100.01

**溶血價의 性別 分布:** 닭의 性이 雞血清의 溶血價에 미치는 影響을 調査하였다. 그러기 위해서 수 닭 血清 205例와 암 닭 血清 139例의 溶血價를 測定하였다. 그리고 그 結果를  $\chi^2$ 檢定法으로 分析한 結果는 Table 3과 같다. 自由度 4에 대한  $\chi^2=5.195$ ( $p=0.50\sim0.25$ )로서 有意性이 認定되지 않았으며 따라서 닭 血清의 溶血價는 닭의 性과 關係敘이 獨立的임을 알 수 있었다. 다시 이 成績을 百分率로 하여 arcsin 變換後 分

散分析한 結果 溶血價間에는 有意性이 認定되었으나 性別에 따른 溶血價의 差異에는 有意性이 認定되지 않았다.

Table 3. Distribution of Hemolytic Titer of Normal Chicken Sera on Sheep Erythrocytes Based on Sex Difference

Reciprocal of Hemolytic Titer	Male		$\chi^2$ Value	
	Number	(%)		
<2	41	(20.0)	35 (25.18)	
2	24	(11.10)	27 (19.42)	
4	62	(30.24)	31 (22.30)	
8	64	(31.21)	39 (28.27)	
16	14	(6.82)	7 (5.02)	5.195

F 13.109\*\*

**溶血價의 年齡別 分布:** 닭의 年齡이 雞血清의 溶血價에 미치는 影響을 調査하였다. 그러기 위해서 6月齡의 닭血清 156例(溶血價 16인 것 11例, 8인 것 41例, 4인 것 44例, 2인 것 22例, 2 以下인 것 38例), 6月齡에서 1年齡인 닭血清 131例(溶血價 16인 것 7例, 8인 것 40例, 4인 것 39例, 2인 것 17例, 2 以下인 것 28例), 1年齡 以上的 닭 血清이 57例(溶血價 16인 것 3例, 8인 것 22例, 4인 것 10例, 2인 것 12例, 2 以下인 것 10例)를 供試하였다. 이 成績은 Table 4에서 보는 바와 같다.  $\chi^2$ 檢定 結果 닭의 年齡과 溶血價와의 關係는 없는 것으로 밝혀졌다. 더욱 이 成績을 百分率로 表示하여 arcsin 變換後의 分散分析 結果도 溶血價間의 差異에는 高度의 有意性이 認定되었으나 年齡에 따른 溶血價의 差異에는 有意性이 認定되지 않았다.

**反應溫度가 細羊赤血球에 대한 雞血清의 溶血價에 미치는 影響:** 新鮮한 닭의 血清은 細羊의 赤血球를 溶血하여 그 反應溫度에 따라 溶血速度에 差異가 있음

Table 4. Age Distribution on Hemolytic Activity of Normal Fresh Chicken Sera on Sheep Erythrocytes

Hemolytic Titer	Age	Number of Chicken				$\chi^2$ Value
		6 Months	6~12 Months	Above 12 Months	Total	
<2		38	28	10	76	
2		22	17	12	51	
4		44	39	10	93	
8		41	40	22	103	
16		11	7	3	21	$\chi^2=7.639$

F 12.481\*

을 알게되어 이實驗을 하였다. 그러기 위해서反應溫度를 각각  $2^{\circ}\text{C}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $46^{\circ}\text{C}$  그리고  $56^{\circ}\text{C}$ 를擇하여溶血反應을 하였다. 溶血度는 分光光電計로測定하였으며 實驗成績은 Fig. 1과 같다. 여기에서 血清의 最大溶血能力은  $46^{\circ}\text{C}$ 에서 觀察되었고 最小溶血能力은  $56^{\circ}\text{C}$ 에서 觀察되었으며 아울러 犀血清의 溶血性成分은  $56^{\circ}\text{C}$ 에서 破壞되는 것임을 알 수 있었다.

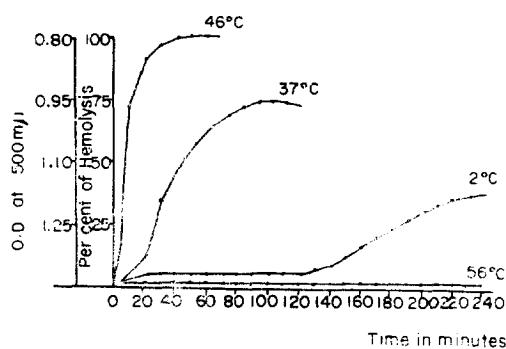


Fig. 1. Effect of hemolytic reaction temperature on normal chicken serum and sheep erythrocytes.

反應 pH가 細羊赤血球에 대한 犀血清의 溶血價에 미치는 影響: 이實驗에서는 犀血清과 細羊赤血球間의溶血反應에 있어서의 pH가 어떤 影響을 주는가를 實驗하였다. 그려기 위해서 pH 6.0과 6.5는 0.05 M醋酸으로, pH 7.0과 7.5는 0.05 M磷酸으로 그리고 pH 8.5는 0.05 M veronal로 각각 緩衝生理食鹽水를 만들어서 使用하였다. 그리고 각試驗群의 反應物은 해당 pH溶液으로 處理하여 反應케 하였다.

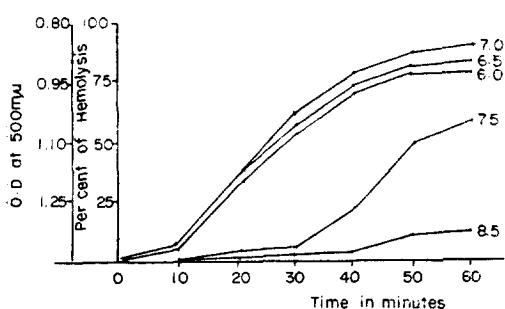


Fig. 2. Effect of hemolytic reaction on pH of normal chicken serum and sheep erythrocytes at  $46^{\circ}\text{C}$ .

試驗成績은 Fig. 2와 같다. 즉 犀血清의 最大溶血度는 pH 7.0에서 最小溶血度는 pH 8.5에서 관찰되었다. 그러나 pH가 6.0내지 7.0에서는 큰 差異가 없었다.

**Mg<sup>#</sup>과 Ca<sup>#</sup>이 犀赤血球에 대한 犀血清의 溶血價에 미치는 影響:** 犀血清의 細羊赤血球에 대한 溶血作用에 Mg<sup>#</sup>과 Ca<sup>#</sup>이 관여되는가를 實驗하였다<sup>10, 19, 18, 20</sup>. veronal 緩衝生理食鹽水를 基本溶液으로 하고 두별의 0.05 M Mg<sup>#</sup>과 Ca<sup>#</sup>의 네試驗群을 만들어 이중 Mg<sup>#</sup>과 Ca<sup>#</sup>의 두試驗群은 그대로 남아 두試驗群에는 각각 0.05 M의 EDTA를 첨가하였다. 그리고 Fig. 3에서처럼 Mg<sup>#</sup>과 Ca<sup>#</sup>을 각각 增量 첨가하면서 溶血度를 遷시 分光光電計로 测定하였다. 이의 成績은 Fig. 3에서와 같다. 즉 Mg<sup>#</sup>(0.0005 M~0.05 M)은 溶血作用에 아무런 抑制作用이 없었고 EDTA의 混在下에서는 Mg<sup>#</sup>의 量이 增加되면 溶血作用이 재현되었다. Ca<sup>#</sup>은 0.00055 M以下에서는 溶血作用을 도왔으나 增量되거나 EDTA-Ca<sup>#</sup>群에서는 모두 溶血作用이 抑制되었다. 이事實은 溶血作用에 Mg<sup>#</sup>이 必要하다는 것과 Ca<sup>#</sup>은 溶血作用에 0.00055 M以上은 必要없다는 것을 알려주었다.

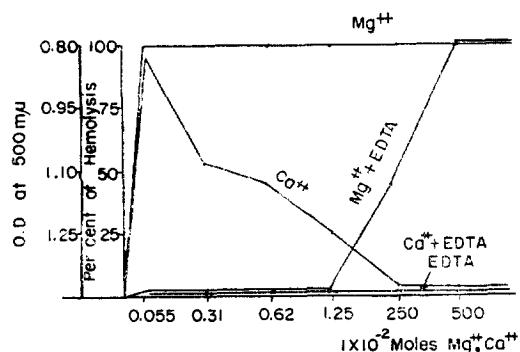


Fig. 3. Effect of Mg<sup>#</sup> and Ca<sup>#</sup> on hemolytic reaction of normal chicken serum and sheep erythrocytes.

**補體分析法에 의한 犀血清 分割의 溶血能:** 補體稀釋法에 의해서 新鮮한 犀血清을 分割하고 沈澱物은 C 1, 3으로 그리고 上層液을 C 2, 4로 하였다. 한편  $56^{\circ}\text{C}$ 에서 30分 加熱處理한 血清은 C 3, 4로 하였다. 한편 新鮮한 血清을 zymosan으로 處理하여 C 1, 2, 4를 그리고 ammonia水로 처리하여 C 1, 2, 3을 만들었다. 이와같은 여러 血清分割은 最終稀釋倍數가 이미 1/5로 되어 있기 때문에 이것을 原液으로 삼아 2倍까지 稀釋하여 사용하였다. 이러한 各成分을 각기 濃

血反應法에 따라 실험한 결과 Table 5와 같은 成績을 얻었다.

Table 5. Hemolytic Activity of Chicken Complement Fractions on Sheep Erythrocytes

Fractions (ml.)	Sheep Erythrocytes (%)	Hemolytic Reaction
C 2, 4 (0.2)	0.2 ml	Positive
C 1, 3 (0.2)	0.1~0.2 ml.	Negative
C 3, 4 (0.2)	0.1~0.2 ml.	Negative
C 1, 2, 4 (0.2)	0.1~0.2 ml.	Negative
C 1, 2, 3 (0.2)	0.1~0.2 ml.	Negative

C 2, 4分割 0.2 ml.와 1%의 細羊赤血球 0.2 ml.를 混合하여 46°C에서 30分間 反應하였더니 溶血이 일어났다. 그러나 C 1, 3分割, C 3, 4分割, C 1, 2, 4分割 그리고 C 1, 2, 3分割 0.2 ml.는 1% 細羊赤血球를 溶血치 못하였다. 한편 C 2, 4分割, C 1, 3分割, C 3, 4分割, C 1, 2, 3分割 그리고 C 1, 2, 4分割의 溶血反應에 미치는 相互間의 質과 量의 關係를 밝히기 위해서 Table 6과 같은 分割의 組合을 만들어 試驗하였던바 Table 6과 같은 成績을 얻었다.

이상과 같은 實驗으로 膜血清에 의한 細羊赤血球의 溶血은 C 2, 4分割에 기인한다는 것이 증명되었다.

膜血清에 의한 細羊赤血球의 溶血過程의 電子顯微鏡的 觀察：膜血清에 의한 細羊赤血球의 溶血機作을 밝히기 위해서 反應物을 電子顯微鏡으로 관찰하였다. 溶血機作의 범주가 기니乏補體에 의한 細羊赤血球 抗原抗體의 溶血에 속하는 것인지 즉 免疫溶血에 기인하는 것인지 赤血球膜의 어떤 基質에 선택적으로 손상을 주어서 溶血을 일으키는 것인지 또는 物理的인 機作에 의한 단순한 赤血球膜의 破壞에 기인하는 것인지를究明하기 위해서였다.

膜血清에 의한 細羊赤血球의 溶血은 兩者가 混合되고 一定한 時間이 경과하면 赤血球膜은 마치 편치로 뚫은듯이 正圓型의 구멍이 생겨 赤血球가 破壞되는 것을 관찰할 수 있었다. 즉 血清成分이 赤血球에 혼합되면 膜의 한 部位의 中心部는 溶解되듯이 구멍이 뚫리게 되고 그 구멍의 延伸이 달려 들어가기 때문에 구멍은 더욱 커지게 되었다. 赤血球를 處理한 膜血清의 濃度에 따라 큰 구멍은 6000倍의 擴大倍率로 쉽게 識別할 수 있는 것을 여러개 볼 수 있고(Fig. 7) 작은 구멍은 15萬~20萬倍로 擴大하여도 겨우 식별할 수 있을 정도로 작았다. 한편 구멍의 延伸부위의 膜은 말리어 들어가는 외에 赤血球膜의 小破裂片으로 되어 떨어져 나갔다. 이 破裂된 赤血球膜의 小片을 高倍率로 관찰하였다니 여기에도 여러개의 작은 구멍이 뚫려 있는 것을

Table 6. Hemolytic Activity of Chicken Complement Fractions on Sheep Erythrocytes

	C2, 4			C1, 3			C3, 4			C1, 2, 3			C1, 2, 4			Sheep Erythrocytes(ml)
	0.1	0.2	0.4ml	0.1	0.2	0.4ml	0.1	0.2	0.4ml	0.1	0.2	0.4ml	0.1	0.2	0.4ml	
C2, 4	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0.2
	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0.2
	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0.4 ml
C1, 3	4	4	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0.2
	4	4	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0.2
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0.4 ml
C3, 4	4	4	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0.2
	4	4	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0.2
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0.4 ml
C1, 2, 3	4	4	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0.2
	4	4	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0.2
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0.4 ml
C1, 2, 4	4	4	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0.2
	4	4	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0.2
	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0.4 ml

볼 수 있었다(Fig. 4, Fig. 5).

赤血球膜에 구멍이 뚫리면 赤血球의 内容物이 外部로 流出되는 過程을 볼 수 있었고(Fig. 4) 이렇게 赤血球의 内容物이 外部로 流出되고 없어진 것은 원래의 크기보다 심히 萎縮되어 더욱 時間이 經過됨에 따라 赤血球의 内容物이 外部로 모두 流出되면 그 赤血球의 形態가 이지려져 識別이 困難하게 되었다.

對照群으로는 無處理 正常綿羊 赤血球群과 기니피補體處理 純羊赤血球群 그리고 蒸溜水로 處理한 純羊赤血球群의 세 가지를 두었다. 正常赤血球液을 veronal-NaCl等張緩衝液으로 여러번 洗滌 稀釋 그리고 染色하여 電子顯微鏡으로 관찰하였다. 이와같은 新鮮한 正常純羊赤血球는 거의 完全한 球形이며 Fig. 6과 같았다.

기니피補體에 의한 純羊赤血球의 溶血反應은 補體結合反應의 術式에 의해 실시하였다. 純羊의 赤血球液에 溶血素를 加하여서 赤血球를 感作시킨 후에 기니피補體를 가하고 시간이 조금 지나면 溶血反應이 일어났다. 이때 溶血反應이 일어나는 溶血速度는 溶血素와 補體의 力價 그리고 그量에 직접적으로 관계가 되는 것을 확인하였다. 그러므로 溶血素와 기니피補體에 의해서 일어나는 溶血速度는 胎血清에 의해서 일어나는 溶血反應과 같은 時間에 溶血이 일어나게끔 溶血素와 기니피補體를 調節하여 使用하였다.

위와같이 實施한 溶血反應에서 溶血되고 있는 赤血球를 관찰한 것은 Fig. 8과 같다. 이러한 赤血球의 溶血狀態는 新鮮한 胎血清에 의한 溶血現象과同一한 溶血過程을 보여주었다. 溶血素에 의해서 感作된 赤血球膜은 기니피補體의 作用으로 편치로 뚫은듯이 구멍이 뚫리고 그 구멍으로 赤血球의 内容物이 流出되는 溶血反應이었다. 이와같은 溶血過程은 胎血清에 의한 溶血과 매우 흡사하였다. 電子顯微鏡의 低倍率로도 관찰할 수 있을 정도의 赤血球膜의 變化만이 아니라 高倍率擴大에서 膜의 破裂로 생긴 小膜片에서도同一한 狀態가 관찰되었다.

중유수에 의한 純羊赤血球의 溶血過程을 관찰하기 위하여 小量의 물을 純羊赤血球液에 가하여 溶血되게 하였다. 이 溶血은 Fig. 9에서 보는 바와 같다. 이것은 물이 赤血球와 混合되자 곧 赤血球膜이 폭발되듯이 산산 조각으로 破裂됨을 관찰하였다. 또 赤血球의 破裂膜에서나 破裂膜의 小膜片에서도 赤血球의 内容物이 流出한 구멍이라고는 찾아 볼 수 없었다. 다만 이 때 赤血球의 内容物은 폭발되듯이 破壞될 때 一時에 外部로 流出됨으로 溶血速度가 보다 빨랐다. 이러한 赤血

球의 溶血現象은 低倍率 擴大로서도 쉽게 관찰할 수 있었다.

## 考 察

直接補體結合反應에 있어서 家兔의 抗綿羊 赤血球血清은 純羊赤血球抗原과 結合하여 여기에 기니피의 補體가 結合하여 溶血을 이루한다. 그러나 胎의 抗血清과 이에 特異한 抗原과의 結合物에는 기니피의 補體가 結合되지 못한다. 왜냐하면 胎의 抗體—抗原 結合物에는 胎의 補體成分인 C 1과 C 4가 必要하기 때문이다<sup>17)</sup>. 胎補體의 成分이 在存할 때 비로소 기니피補體가 結合하고 反應이 完成된다. 그렇다고 해서 胎의 抗血清으로構成되는 抗體抗原系에 封의 補體를 使用할 수 없다. 封補體는 力價가 얕고 純羊의 赤血球를 溶血하기 때문이다.

이 研究에서는 胎의 補體가 純羊赤血球를 溶血한다는 새로운 事實을 밝히고 溶血物質의 本態와 反應機作을 밝히고자 하였다. 胎血清의 溶血性 物質을 究明하기 위한 實驗으로 우선 胎의 年齡과 性別에 대한 溶血價와의 관계를 실험한 결과 이 溶血現象은 胎의 年齡이나 性別과 아무런 관계가 없다는 것이 밝혀졌는데 이것으로 미루어 보아 胎의 血清에는 純羊의 赤血球를 溶血시키는 어떤 物質이 正常의 으로 들어 있음을 알 수 있었다. 이와같은 溶血現象이 純羊赤血球에 기인하지 않는다는 근거는 실험적으로 밝히지는 않았으나 胎血清에 대한 여러個體의 純羊赤血球가 모두同一한 溶血力價를 보인 점으로 보아 이 溶血反應은 純羊赤血球에 기인하는 것이 아니라 胎血清에 기인한다고 볼 수 있다. 胎의 年齡에 따라 力價가 上昇되는 P凝集素<sup>12)</sup>와도 아무런 관계가 없는 物質임을 말해주고 있다.

胎血清과 純羊赤血球와의 溶血反應의 必要要因에 관한 實驗에서 反應溫度는 37°C에서 中等度로 그리고 46°C에서 가장 反應이 잘 되었는데 이것은 일반적인 補體結合反應의 溫度보다 약 10°C의 높은 溫度를 요구하는 점이 흥미있는 일이라 믿어진다.

溶血反應의 可能 pH는 6.0에서 7.0이나 7.0이 最適 pH인 반면에 pH 7.5나 8.5 그리고 6.0以下에서는 反應이 부진하였다. 溶血反應에 必要한 co-factor를 調査한 결과 一定 反應量에 대해 Mg<sup>2+</sup>은 0.00055 M에서 0.05 M까지 溶血力價를 增加시켰으나 Ca<sup>2+</sup>은 0.0005 M以上일 때 溶血力價를 低下시켰다. 한편 Mg<sup>2+</sup>이나 Ca<sup>2+</sup>의 co-factor적인 역할은 EDTA를 첨가함으로써 그 기능을 상실하였다. 이상과 같은 Co-factor의 요구는 胎

血清中에 存在하는 溶血反應 物質이 마치 기니피補體의 것과 흡사함을 알 수 있게 하였다.

닭血清의 溶血性物質에 대한 補體成分의 構成을 알고서 補體成分 分析을 한 결과 新鮮한 鸞血清은 56°C에서 30분에 不活化됨으로 우선 易熱性 血清成分에 기인함을 알 수 있었다. 그래서  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  水溶液으로 烹熟하여 易熱性 成分을 C 1, 3分割과 C 2, 4分割으로 나누어 실험한바 C 1, 3分割은 不活性한 반면에 C 2, 4分割은 溶血을 띠웠다. 한편 新鮮한 血清을 ammonia 水로 處理하면 不活化됨으로써 C 4가 관여함을 알 수 있었다<sup>27)</sup>. 그런데 C 2, 4分割을 大量의 zymosan으로 處理하면 不活化되는 것은 C 2, 4中 한가지 또는 두가지 成分이 모두 吸着되는 까닭으로 믿어진다. 왜냐하면 zymosan이 C 3만을 吸着하고 다른 補體成分은 吸着치 않는다고 가정하면 Table 6에서 볼 수 있는바 C 2, 4와의 反應에서 C 1, 3, C 3, 4 그리고 C 1, 2, 3과의 溶血程度는 C 3이 들어있지 않는 C 1, 2, 4와의 溶血程度 보다 強해야 했는데 모두 溶血程度가 C 2, 4에 좌우되는 것으로 보아 C 3은 관여하지 않음을 알 수 있었다. 그리고 Ch C 2, 4가 細羊赤血球를 溶血하는 일은 細羊赤血球와 이의 特異抗體가 Gp C의 存在下에서 溶血될때 Gp C의 Gp C 2, 4와 函數의 관계가 있다는 事實<sup>23, 21, 22)</sup>과 매우 흡사하였다. 이와는 반대로 이 研究에 적용한 補體分割方法이 완전한 것이 못되어 모든 分割中에 少量이나마 C 3이 오염되어서 이것이 C 2, 4에 참여하여 溶血을 일으켰다고도 생각할 수 있다. 그래서 C 2, 4를 zymosan으로 처리하면 少量의 C 3이 吸着되어서 溶血이 일어나지 않게 된다고도 생각된다. 溶血力價가 낮은 鸞血清(1/4, 1/8)은 血清 1.0 ml 당 1.35 mg의 zymosan으로 溶血成分을 完全히 吸着할 수 있었으나 溶血價가 높은 血清(1/16)은 血清 1.0 ml 당 2.70 mg의 zymosan이 필요하다는 것으로도 溶血成分과 zymosan의 관계가 깊고 또한 zymosan은 C 3을 吸着하는 것임에서 앞에서 지적한 각 分割에 C 3이 오염되었다고 짐작할 수 있다.

溶血機作에 있어서 C 2, 4分割이나 C 2, 3, 4成分이 어떻게 溶血機構를 活性화해서 細羊赤血球로 하여금 溶血되게 하는가는 앞으로 研究되어야 할 중요한 문제이다.

닭血清의 溶血成分이 血清의 어느分割에 存在하는가 그리고 溶血價와 albumin과 globulin의 比에는 어떻한 관계가 있는가를 突明하고자 鸞血清을 濾紙電氣泳動<sup>2, 13, 26, 29, 30)</sup>과 薄層 chromatography<sup>4)</sup>를 실시하였다. 그리고 Hu C나 Gp C에서처럼 보다 많은 補體分割을 얻기

위한 Sephadex나 DEAE cellulose를 사용하는 column chromatography를 實施하고 여기에서 얻은 여러 分割의 溶血價를 測定한 결과 A/G와 溶血價와의 차이는 없었고 溶血價에 관계 있는 成分이 薄層 chromatography로 檢出되지 않았으며 column chromatography에 의한 Ch C分割도 Gp C나 Hu C에서처럼 分離가 가능하지 못하였다.

正常 鸞血清의 細羊赤血球에 대한 溶血機作을 突明하기 위한 實驗의 하나로 鸞血清에 露出된 바 있는 細羊赤血球를 電子顯微鏡으로 溶血의 類型을 관찰하였다. 지금까지 알려진 溶血의 類型中 기니피補體에 의한 免疫溶血은 溶血孔이 圓形이고 邊緣은 白色을 띠우는 것으로 알려져 있다<sup>7, 16)</sup>. 한편 非免疫性 溶血에 있어서는 赤血球膜에 存在하는 反應 基質에 따라 選擇的인 溶血孔이 形成되는 것으로 알려져 있다. 예를 들어 saponin은 赤血球의 cholesterol層을 溶解함으로써 溶血孔의 모양이 六角形을 이룬다는 것이다<sup>1)</sup>. 이 實驗에서는 溶血孔이 둑과 頭의 血清濃度가 높으면 形成되는 溶血孔의 數와 크기가 增加하였고 기니피補體에서처럼 溶血孔의 邊緣이 白色을 띠었다. 따라서 鸞血清에 의한 細羊赤血球의 溶血 類型은 補體에 의한 免疫溶血에 속하는 것으로 思料된다. 이것을 뒷받침하는 것으로 對照群中의 기니피補體에 의한 免疫溶血反應의 所見과 本反應의 所見이一致한 反面에 증류수에 露出된 赤血球의 溶血 類型과는 判異한 것이다. 즉 증류수 處理群은 溶血이 폭발적으로 일어났고 溶血孔을 찾아 볼 수 없는 반면에 터져서 생긴 膜片을 볼 수 있었든 점 등이다.

닭血清에 의한 細羊赤血球의 溶血이 電子顯微鏡所見대로 補體成分에 의한 免疫性 溶血이라고 한다면 補體와 抗體는 鸞血清에 있고 細羊赤血球는 正常의으로 鸞血清에 存在하는 heterophile 抗體에 대한 抗原이 되며 이것이 抗原抗體 結合物을 만들면  $\text{Mg}^+$ 과  $\text{Ca}^+$ 의 存在下에서 頭의 C 2, 4를 主軸으로 하는 補體를 結合하여 溶血을 完成하는 것으로 믿어진다.

## 結論

新鮮한 頭의 正常血清 344例의 細羊赤血球에 대한 溶血에 관여하는 因子 條件에 관한 研究에서 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 全供試血清 344例中 78%에 해당하는 258例가 細羊赤血球에 대해서 뚜렷한 溶血作用을 나타냈다.
2. 細羊赤血球에 대한 鸞血清의 溶血價는 頭의 性이

나 年齡(月齡)에 관계없이 獨立의이었다.

3. 緬羊赤血球를 溶血하는 닭의 血清은 56°C에서 30分間 加熱后으로써 그 溶血能力이 消失되었다.

4. 溶血速度는 46°C에서 가장 빨라서 5分 內外에서溶血現象을 뚜렷하게 관찰할 수 있었다.

5. 溶血反應은 pH의 變化에 따라 크게 差異를 보여 pH가 7.0일때 溶血이 가장 높고 pH 8.0에서는 溶血이 되지 않았다. 그리고 pH가 6.0대지 7.0 사이에서는 큰 차이는 없었다.

6. 닭의 血清이 緬羊赤血球를 溶血하는데 있어서 Mg<sup>+</sup>은 溶血作用을 促進하나 多量의 Ca<sup>+</sup>은 溶血作用을抑制하였다.

7. 該血清의 C 2, 4分割, C 1, 3分割, C 3, 4分割, C

1, 2, 4分割 그리고 C 1, 2, 3分割中 緬羊赤血球에 대한溶血能力은 C 2, 4分割에 국한되었다.

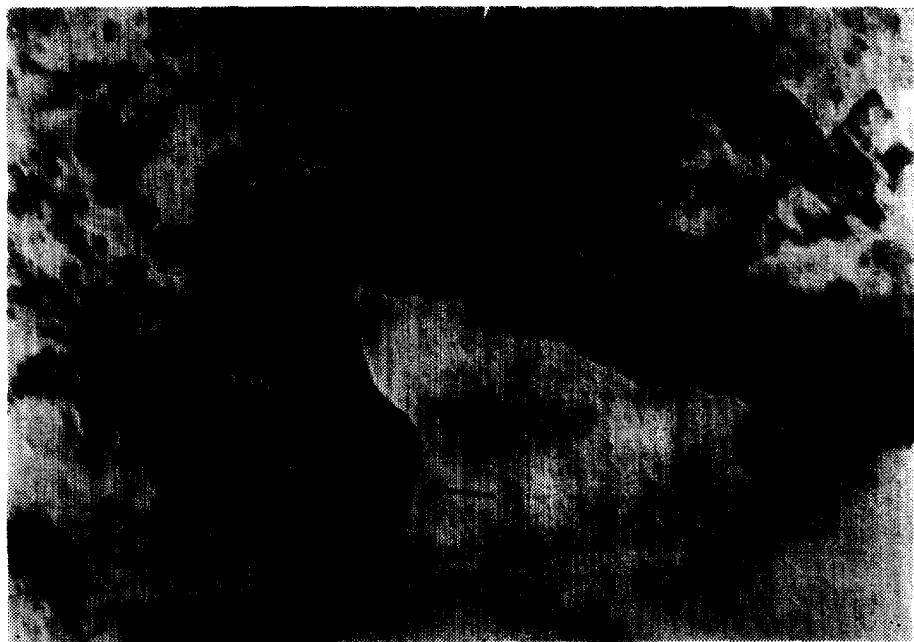
8. 該血清에 의한 緬羊赤血球의 形態의 變化를 電子顯微鏡으로 관찰한 바 緬羊赤血球膜은 免疫溶血時의膜의 모양과 극히 類似하였다. 그리고 그때 생긴 溶血孔은 圓形이며 白色의 環狀으로 쌓여 있었다.

9. 該血清에 의한 緬羊赤血球膜에 形成되는 구멍의 크기와 둘레는 血清濃度와 作用時間에 左右되었다.

謝辭: 이 研究를 遂行함에 있어 始終 積極的으로 指導鞭撻하여주신 全允成 教授님께 深甚한 謝意를 드리는 바입니다.



**Fig. 4.** Electron micrograph showing a part of membrane of sheep erythrocyte hemolyzed with normal chicken serum. Large number of holes are seen on the surface of the membrane. The holes (arrow A) appear black. The edge of the membrane fragment is indicated with arrow B, and C indicated leaking cytoplasm.  $\times 60.000$



**Fig. 5.** Electron micrograph showing a small area of sheep erythrocyte membrane fragment after hemolysis with normal chicken serum. Large number of holes in the surface of the membrane are illustrated. The holes (arrow A) appear black, being filled with phosphotungstate. The edge of the membrane fragment is illustrated by an arrow B.  $\times 204.000$



Fig. 6. With normal sheep erythrocyte.



Fig. 7. With chicken serum.



Fig. 8. With Gp C.



Fig. 9. With water.

Fig. 6. Electron micrograph of normal sheep erythrocyte.  $\times 9,000$

Fig. 7. Electron micrograph showing four large holes on sheep erythrocyte membrane after hemolysis with normal chicken serum.  $\times 9,000$

Fig. 8. Electron micrograph showing three large holes on sheep erythrocyte membrane after hemolysis with hemolysin and guinea pig complement.  $\times 9,000$

Fig. 9. Electron micrograph of sheep erythrocyte membrane which was broken with water.  $\times 9,000$

## 参考文献

1. Bangham, A.D., and Horne, R.W.: Action of saponin on biological cell membranes. *Nature*. 1962. 196 : 952.
2. Beckman Spinco division: Model R, Paper electrophoresis system instruction manual. pp50. RIM-5. 1961.
3. Bier, O.G., Leyton, G., Mayer, M.M., and Heidelberger, M.: A comparison of human and guinea pig complements and thier complement fractions. *J. Exp. Med.* 1945. 81 : 449.
4. Bobbit, J.M., and Kriehber, J.G.: Thin layer chromatography pp15-30. Reinhod, London.
5. Borsos, T., Rapp, H.J., and Mayer, M.M.: Studies on the second component of complement. I.-The reaction between EAC'1, 4 and C'2: Evidence on the single site mechanism of immune hemolysis and determination of C'2 on a molecular basis. *J. Immunol.* 1961. 87 : 310.
6. Borsos, T., Rapp, H.J. and Mayer, M.M.: Studies on the second component of complement. The nature of the decay of EAC'1, 4, 2. *J. Immunol.* 1961. 87 : 326.
7. Borsos, T., Dourmashkin, R.R., and Humphrey J.H.: Lesions in erythrocyte membranes caused by immune haemolysis. *Nature*. 1964. 202. 251.
8. Borsos, T., and Rapp, H.J.: Immune hemolysis: A simplified method for the preparation of EAC'4 with guinea pig or with human complement. *J. Immunol.* 1967. 99 : 263.
9. Brenner, S., and Horne, R.W.: A negative staining method for high resolution electron microscopy of virus. *Biophys. Acta*. 1959. 34 : 103.
10. Bryant, R.E., and Jenkins, D.E.: Calcium requirements for complement dependent hemolytic reactions *J. Immunol.* 1968. 101 : 664.
11. Bukantz, S.C., Rein, CR., and Kent, J.F.: Studies in complement fixation. II.-Preservation of sheep's blood in citrate dextrose mixture (Modified Alsever's solution) for use in the complement fixation reaction. *J. Lab. Clin. Med.* 1946. 31 : 394.
12. Cho, B.R.: Studies on an agglutinin in normal chicken serum for periodate-treated erythrocytes. *Ph. D. Thesis of University of Minnesota*, 1961.
13. Common, R.H., Mckinley, W.P., and Maw, W.A.: Filter paper electrophoresis of avian serum proteins. *Science*. 1953. 118 : 36.
14. Dourmashkin, R.R., Dougherty, R.M., and Harris, R.J.: Electron microscopic observation on rous sarcoma virus and cell membranes. *Nature*. 1962. 194 : 1116.
15. Frank, M.M.: Observation on the mechanism of immune hemolysis: Importance of immunoglobulin class and source of complement on the extent of damage. *J. Immunol.* 1970. 104 : 1502.
16. Humphrey, J.H., and Dourmashkin, R.R.: Electron microscope studies of immune cell lysis. *Ciba foundation symposium "Complement"* 176. 1965.
17. Jeon, Y.S.: Modified complement fixation test of avian infectious bronchitis virus. *Ph. D. Thesis of University of Minnesota*. 1962.
18. Levine, L., Cowan, W., Osler, A.G., and Mayer, M.M.: Studies on the role of  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{Mg}^{++}$  in complement fixation and immune hemolysis. I. Uptake of complement nitrogen by specific precipitates and its inhibition by ethylene diamine tetra acetate. *J. Immunol.* 1953. 71 : 359.
19. Levine, L., Cowan, W., Osler, A.G., and Mayer, M.M.: Studies on the role of  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{Mg}^{++}$  in complement fixation and immune hemolysis. II. The essential role of calcium in complement fixation. *J. Immunol.* 1953. 71 : 367.
20. Levine, L., Cowan, W., Osler, A.G., and Mayer, M.M.: Studies on the role of  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{Mg}^{++}$  in complement fixation and immune hemolysis. III. The respective role of  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{Mg}^{++}$  in immune hemolysis. *J. Immunol.* 1953. 71 : 374.
21. Loos, M., Borsos, T., and Rapp, H.J.: Immune hemolysis and the functional properties of the second (C 2) and fourth (C 4) components of complement. I. Functional differences among C 4 sites on cell surfaces. *J. Immunol.* 1970. 105 : 1439.
22. Loos, M., Borsos, T., and Rapp, H.J.: Immune hemolysis and the functional properties of the

- second (C 2) and fourth (C 4) components of complement. II. Clustering of effective C4, 2 complexes at individual hemolytic sites. *J. Immunol.* 1971. 106 : 407.
23. Loos, M., Borsos, T., and Rapp, H.J.: Immune hemolysis and the functional properties of the second (C 2) and fourth (C 4) components of complement. IV. Formation of EAC<sub>42</sub> by treatment of C 2 with trypsin in the presence of EAC4. *J. Immunol.* 1972. 109 : 434.
24. Mayer, M.M.: Studies on the mechanism of hemolysis by antibody and complement. *Progr. Allergy.* 1958. 5 : 215.
25. Mayer, M.M.: Kabat and Mayer's Experimental Immunoochemistry. C.C. Thomas Publisher, Springfield, Ill. 1961.
26. McKinley, W.P., Oliver, W.F., Maw, W.A., and Common, R.H.: Filter paper electrophoresis of serum protein of the domestic fowl. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 1953. 84 : 346.
27. Pillemer, L., Seifter, J., and Ecker, E.E.: The effect of amino compounds on the fourth component of complement. *J. Immunol.* 1941. 40:
- 89.
28. Pillemer, L., Blum, L., Lepow, I.H., Wurz, L., and Todd, E.W.: The properdin system and immunity. III. The zymosan assay of properdin. *J. Exp. Med.* 1956. 103 : 3.
29. Shelter, M.R.: Comparison of continuous and strip paper electrophoresis techniques for study of serum glycoproteins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1956. 93 : 47.
30. Straus, R., and Wurm, M.: A new staining procedure and a method for quantitation of serum lipoproteins separated by paper electrophoresis. *Am. J. Clin. Path.* 1958. 29 : 6. 581.
31. Weinrach, R.S., and Talmage, D.W.: The role of antibody in immune hemolysis. *J. Infect. Dis.* 1958. 102 : 74.
32. 電子顯微鏡學會 關東支部 : 電子顯微鏡試料技術集. pp6. 84. 288. 誠文社 新光堂. 東京. 1970.
33. 電子顯微鏡 : Hitachi-HU-11E-1, Double condenser, aperture 4.5 Å
34. 李英燮 : 鮑汁血清의 親補體作用에 관한 研究. 서울大學校 大學院. 碩士學位論文. 1964.

### Studies on hemolytic reaction of normal chicken serum and sheep erythrocytes

Seo, Ik Soo

*Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture  
Seoul National University*

#### Abstract

Hemolytic reaction of normal fresh chicken serum on sheep erythrocytes was studied and the following experimental results were obtained and summarized.

1. Chicken sera, 258 (78%) out of 344 samples showed hemolytic activity on sheep erythrocytes.
2. Distribution of a different hemolytic titer of chicken sera was not dependent to sex and age difference of test chicken.
3. Hemolytic activity of serum component obtained from normal fresh chicken was heat inactivated at 56°C. 30 minutes heating.
4. The most enhanced hemolytic activity of chicken serum on sheep erythrocytes was observed at the incubation temperature of 46°C.
5. The most effective pH for the hemolytic reaction of chicken serum on sheep erythrocytes was observed at 7.0, and pH 6.0 or 8.5 resulted less or no hemolysis.
6. Hemolytic reaction of chicken serum and sheep erythrocytes required Mg<sup>+</sup> and Ca<sup>+</sup> ions as

co-factor, and the former was required more compared to the latter.

7. Hemolytic activity of chicken serum was observed in ChC 2, 4 fraction but not in ChC 1, 3, ChC 3, 4, ChC 1, 2, 4 and ChC 1, 2, 3 fractions.

8. In electron micrography, morphological changes of sheep erythrocyte membrane by normal chicken serum was similar to that of immune hemolysis: that was, the hemolytic hole was circular and it was surrounded with a white ring.

9. Electron micrography of morphological changes on sheep erythrocyte membrane indicated that the size of hemolytic hole and white ring were functional to the chicken serum concentration used and reaction time.