

육계의 혈청중 면역글로부린(IgA, IgG, IgM) 농도의 발육시기별 변화상

II. IgA 분리 및 발육시기별 농도수준

김정우 · 이민호 · 김춘수 · 김상희¹ · 박근식¹

단국대학교 축산학과

Developmental Changes of Serum IgA, IgG and IgM Concentrations in Broiler Chicks

II. Isolation of IgA and Developmental Changes of Serum IgA Levels

J. W. Kim, M. H. Lee, C. S. Kim, S. H. Kim¹ and K. S. Park¹

Department of Animal Science, Dankook University, Cheonan, Korea 330-714

ABSTRACT

An experiment was conducted to establish a large scale production method of anti-serum against chicken IgA and to profile the developmental changes of serum IgA levels during the feeding period(from hatching to 7 weeks of age) in broiler chicks. Blood samples were taken from Hubbard chicken at the age of hatching, 3 days of age, and weekly thereafter till to 7 weeks of age. The pure IgA was isolated from ammonium sulfate treated chicken bile juice by gel filtration chromatography(Sepharose CL-6B). The quantitative assay of serum IgA were carried by RID method. Developmental changes of serum IgA concentrations were 0.42 mg/mL at hatching, thereafter decreased gradually, lowest at 1 week of age(0.17 mg/mL), and gradually increased to 7 weeks of age(2.73 mg/mL). There was no sexual difference in serum IgA level, but female chicks showed higher IgA levels than male chicks during the experimental period.

(Key words: IgA purification, serum IgA concentration, broiler chicks)

서 론

가금류의 분비물에서 IgG나 IgM이 아닌 새로운 면역글로부린이 다량 존재함을 Lebacqz-Verheyden 등(1974)이 발견한 이래, 많은 연구자들에 의하여 광범위하게 연구되어 왔다. 분비물내의 이 면역글로부린의 특성은 포유동물의 IgA와 일치하지는 않으나 그 물리적 및 화학적 구조와 기능이 유사하여 이를 IgA로 명

명하게 되었다. 가금의 분비물내의 IgA (secretory IgA)는 대부분 2중합체 (dimer)로 존재하며 분자량은 350,000~360,000 정도로서 흡광계수는 13.0 이다 (Leslie & Martin, 1973, Higgins, 1975). 포유동물의 secretory IgA는 기능적으로 매우 중요한 역할을 하는 분비편(secretory piece)을 가지고 있으나 가금의 IgA에서는 아직 발견되지 않았다(Wang & Fudenberg, 1974). 혈청중 IgA를 Sephadex G-200 column에서 여과하면 분자량이 200,000 이상의 IgA

본 연구는 과학기술처의 특정연구개발 사업 연구비(1992) 지원으로 수행되었음.

¹ 가축위생 연구소(Veterinary Research Institute, RDA)

분자가 주성분을 이루며 일부는 약 180,000인 IgA 분자로 존재한다(Bienstock et al., 1973).

IgA의 분리는 닭의 혈청이나 담즙으로부터 Sephadex G-200 Gel filtration 법에 의하여 시행되고 있으며(Benedict, 1967, Leslie & Clem, 1969, Rammensee, 1984) 특히 담즙에는 주로 IgA가 다량 함유되어 있기 때문에 비교적 용이하게 분리되는 장점을 가지고 있다. 가금류의 IgA가 horse spleen ferritin과 streptococcal A antigen에 대하여 항체능력을 가진다고 보고된 바는 있으나 병원성 항원에 대한 임상적 가치에 대하여는 아직 세부적으로 규명되지는 못한 실정이다(Higgins, 1975).

닭의 혈청중 IgA의 평균 농도는 성계(산란계)의 경우 0.22 mg/mL~0.67 mg/mL 수준이며 4개월령 중추는 2.12 mg/mL, 6개월령은 0.15~0.24 mg/mL 수준으로 보고하였다(Kincade & Cooper, 1973, Schraener et al., 1987). 부화 후부터 4일령까지의 초생추의 혈청 IgA의 존재 유무에 대하여는 연구자간에 서로 다른 결과들이 보고되었다. Rammensee(1984)는 4일령 이전부터 IgA가 미량 존재한다고 보고한 반면에 Leslie등(1973)은 없다고 보고하고 있다. 이와같이 닭의 혈청중 IgA의 농도 수준에 관한 연구결과는 연구자들 간에 아직도 일치하지 않는 실정이다. 상기의 결과들은 대부분 산란계를 대상으로 한 연구로서 사육 전기간을 통하여 조사된 체계적인 연구사례는 아직 미흡한 실정이며 특히 육용계를 대상으로 혈중 IgA농도 변화에 대하여 발육시기별로 연구된 보고사례는 접할수가 없다.

따라서 본 연구는 일차적으로 혈청 IgA의 측정법을 정립하기 위하여 순수한 IgA와 면역혈청(anti-IgA)을 자체생산하고, 이를 이용하여 건강한 육용계에서 혈청중 IgA 농도의 주령별 수준변화에 대한 profile을 설정함으로써 IgA 수준과 관련된 제반 연구에 활용할수 있는 parameter를 제공하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. IgA의 순수분리 및 동정

IgA는 성계의 담즙(bile juice)으로부터 Rammensee (1984)가 실시한 방법을 수정 보완하여 am-

monium sulphate 침전법과 gel filtration chromatography법을 이용하여 Figure 1의 과정을 거쳐 분리하였다.

분리된 IgA의 동정은 Sigma사(USA) 및 Nordic Immunological Laboratories사(Netherlands)로부터 구입된 항혈청을 이용하여 double immunodiffusion 법에 의하여 실시하였다.

2. 항혈청 (Anti-IgA)의 대량생산

닭의 IgA에 대한 항혈청 (anti-IgA)의 생산은 분리 동정된 물질을 면역원으로 김정우 등(1993)의 방법으로 토끼에게 면역시켜 생산하였다.

3. 혈청중 IgA의 양적측정 방법

혈청IgA의 농도측정은 Mancini 등(1965)에 의해 개발된 single radial immunodiffusion test (RID-test)를 이용하였다. IgA standard는 2.4mg/mL, 1.2mg/mL, 0.6mg/mL, 0.3mg/mL, 0.15mg/mL로 표준농도를 작성하여 사용하였고, humidity chamber에서 diffusion시켜 antigen (IgA)과 antibody(anti-IgA)의 최적 반응시간을 결정하고 이를 이용하여 sample의 IgA 농도를 측정하였다.

4. 닭의 사양 및 시료의 채취

국내에서 사육되고 있는 broiler 품종인 Hubbard 계통을 공시동물로 선정하였다. 부화후 일체의 vaccine program을 생략하였다. 급여사료는 NRC (1984)표준사양에 의거 제조하였으며 항생제 및 기타 촉진제의 첨가배합을 배제하여 생후부터 7주까지 단국대학교 농과대학 실험축사에서 cage 사육방법으로 사육하였다. 기타 일반적인 사양관리는 관례에 의거 실시하였다.

혈액은 1일령, 3일령, 1주령, 11일령, 2주령, 3주령에는 심장에서 채취하였으며, 4주령, 5주령, 6주령, 7주령에서는 날개의 정맥으로부터 1 mL를 채혈한 후, 3000 rpm (2000 g), 4℃에서 30분간 원심분리하여 혈청을 취한후 -20℃에서 보관하면서 IgA 농도측정에 이용하였다.

전 사육기간 동안 체중과 혈청 IgA 농도를 측정

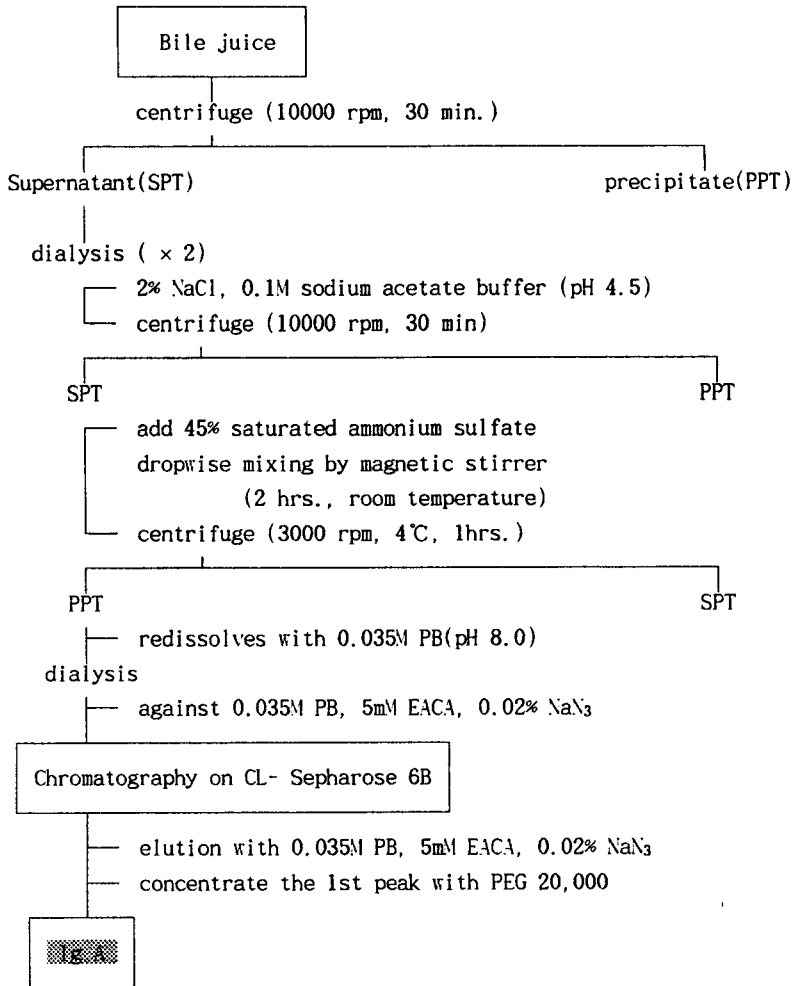


Figure 1. Purification procedure for chicken IgA form bile juice

하였으며 통계처리는 SAS program package의 “GLM” program을 이용하였다.

결과 및 고찰

1. IgA의 순수분리 및 동정

CL-sepharose 6B chromatography column을 통하여 용출된 분획들의 optical density를 UV spectrophotometer (280nm)에서 측정 한 결과는 Figure 2와 같다.

Nordic사로부터 구입한 Anti-IgG, Anti-IgA 및 Anti-IgM을 이용하여 IgA에 대한 순도검사를 double immunodiffusion test에 의해 조사해 본 결과, 첫번째 peak을 형성하고 있는 분획(F1~F4)들이 순수한 IgA를 함유하고 있었으며 이들 분획중 頂上部分의 분획(Figure 2, Figure 3)에는 純粹한 IgA가 고농도로 함유되어 있었다(Figure 3).

2. 항혈청의 생산 및 특이성

닭의 IgA에 대한 항혈청 (Anti-IgA)의 생산은 정

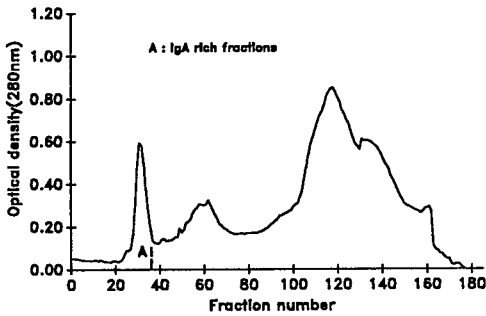


Figure 2. Isolation of IgA chicken bile juice by CL sepharose 6B chromatography.

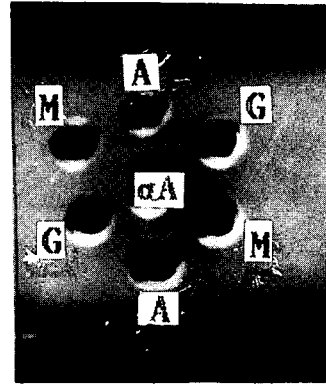


Figure 4. Ouchterlony analysis of antiserum against chicken IgA. αA : antiserum against chicken IgA. A: Chicken IgA, G: Chicken IgG, M: Chicken IgM.

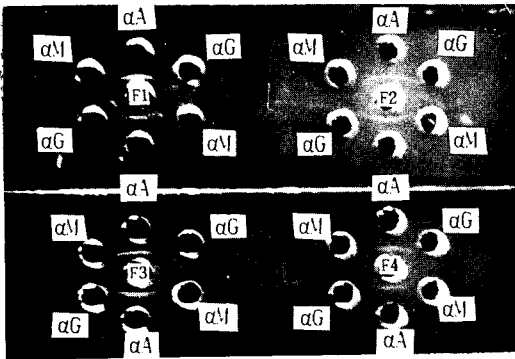


Figure 3. Ouchterlony analysis of purified chicken IgA. F1-F4: pooled fractions from IgA peak. αA : anti-IgA, αG : anti-IgG, αM : anti-IgM.

상부분의 分割으로부터 분리 동정된 IgA를 면역원으로 김정우 등(1993)의 방법에 의거 토끼에게 면역시켜 생산하였다. 생산된 IgA 항혈청중에는 극미량의 IgG 항체가 혼합되어 있는것으로 나타났다. IgA 항혈청이 IgG 항체와 혼합된 이유는 IgA 면역시 IgA의 전체분자를 면역에 사용함으로써 種特異性的 변이에 의한 현상으로 추측된다. 그러나 혈청 IgA의 양적측정시 sample을 희석하거나 agarose gel 에 혼합되는 항체의 농도를 낮출 경우에는 IgG에 대한 diffusion 반응이 일어나지 않기 때문에 IgA의 양적측정에는 저해작용이 없는것으로 판명되었다(Figure 4).

3. 정량측정법의 재현도

Table 1. Regression equation of standard curve and its coefficient of determinant at different time of reading intervals

| Diffusion time(h) | Regression equation of standard curve (SQR(Y) = a + bX) | R ² value |
|-------------------|---|----------------------|
| 22 | SQR(Y) = -2.3115 + 0.5923 X | 0.926 |
| 24 | SQR(Y) = -2.5375 + 0.6172 X | 0.983 |
| 36 | SQR(Y) = -2.7314 + 0.6728 X | 0.982 |
| 48 | SQR(Y) = -0.8947 + 0.2438 X | 0.994 |
| 50 | SQR(Y) = -0.8947 + 0.2438 X | 0.994 |

닭의 혈청중 IgA 농도의 측정은 RID법을 이용하여 실시하였다. 각각의 표준항원(standard IgA)과 항체와의 diffusion 반응결과를 측정하여 작성한 농도값을 square root로 변환하고, 이들을 반응소요시간 별로 표준곡선(standard curve)을 작성한 바, 48시간에서 가장 양호하게 나타났으며 회귀방정식에 대한 결정계수(R²)는 0.994로서 측정의 재현도가 양호하였다 (Table 1).

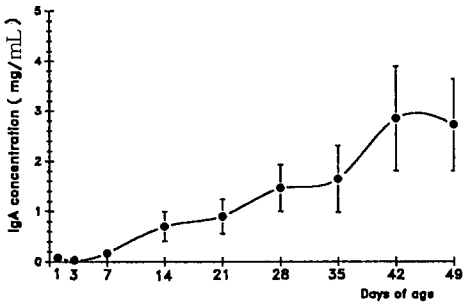


Figure 5. Developmental changes of serum IgA level In broiler chicks during the experimental period.

4. 혈청중 IgA 농도수준의 발육시기별 변화

혈청 IgA의 발육 시기별 수준변화를 보면 부화후 1일령(0.42 mg/mL)부터 약간의 감소 추세를 보여 7일령에는 최저수준인 0.17 mg/mL로 나타났다. 그 이후부터는 서서히 증가하여 생후11일 경에는 발생 당시의 수준에 도달했다가 6주령에는 1.62 mg/mL로서 1일령 수준의 4배 정도로 높게 증가되었다(Figure 5, Table 2). 전 기간중 성별에 따른 IgA의 농도는 유의차가 없는것으로 나타났으나 암컷이 수컷보다 약간 높은 경향을 보였다.

본 실험에서 부화직후의 혈중에 IgA 가 존재하는 것으로 판명되었으며 이 결과는 Rammensee (1984)의 결과와 유사한 것으로 나타났다. 그러나 출생직후의 혈청에서는 IgA가 존재치 않는다고 발표한 Leslie 등(1973)과는 상반되는 결과였다. 그 원인은 구체적으로 규명할 수는 없으나, 대부분의 연구자들은 산란계를 대상으로 한 결과인 반면에 본 실험에서는 vaccine 투여를 전혀 하지않은 육용계를 대상으로 조사하였고 또한 항생제 및 촉진제의 첨가를 배제한 사료를 급여함으로 인한 유전적 및 환경적 차이에 인한것으로 추정된다. 또한 최근에는 저농도의 수준까지 정밀하게 측정할수 있는 면역측정법의 발달로 인하여 미량의 IgA 함량까지 측정이 가능함으로 인한 차이로 생각된다.

Table 2. Developmental changes of serum IgA concentration in broiler chicks during the experimental period

| Days of age | N | Female | | Male | | Mean | |
|-------------|----|--------|------------|------|------------|------|------------|
| | | N | mg /mL | N | mg /mL | | |
| day 1 | 20 | 20 | 0.44±0.203 | 20 | 0.41±0.203 | 40 | 0.42±0.142 |
| day 3 | 20 | 20 | 0.33±0.203 | 20 | 0.30±0.203 | 40 | 0.31±0.142 |
| day 5 | 20 | 20 | 0.35±0.287 | 20 | 0.31±0.287 | 40 | 0.33±0.201 |
| day 7 | 22 | 22 | 0.20±0.102 | 22 | 0.14±0.087 | 44 | 0.17±0.100 |
| day 11 | 20 | 20 | 0.46±0.287 | 20 | 0.42±0.287 | 40 | 0.45±0.287 |
| day 14 | 24 | 24 | 0.76±0.342 | 24 | 0.64±0.236 | 48 | 0.70±0.294 |
| day 21 | 26 | 24 | 0.88±0.353 | 24 | 0.93±0.343 | 50 | 0.90±0.342 |
| day 28 | 22 | 26 | 1.49±0.495 | 26 | 1.43±0.463 | 48 | 1.46±0.469 |
| day 35 | 26 | 28 | 1.66±0.890 | 28 | 1.61±0.396 | 54 | 1.64±0.667 |
| day 42 | 20 | 20 | 2.89±1.102 | 20 | 2.82±1.027 | 40 | 2.85±1.038 |
| day 49 | 28 | 24 | 2.83±0.774 | 24 | 2.62±1.091 | 52 | 2.73±0.920 |

¹ $\bar{X} \pm SD$

적 요

본 실험은 닭의 담즙으로부터 IgA를 순수분리하고 이에 대한 항혈청을 대량 생산하여, IgA의 양적측정에 필요한 물질의 생산을 자체정립하고, 이를 이용하여 육용계의 혈청중 IgA 농도를 측정함으로써 발육시기별 닭의 IgA 수준변화에 대한 기초적인 자료를 제공하고자 실시하였다.

1. 닭의 담즙으로부터 chromatography 를 사용하여 순수한 IgA를 분리하였고, 이를 免疫原으로 사용하여 생산된 항혈청(rabbit anti-chicken IgA)은 특이성이 양호한 것으로 나타났다.
2. 순수분리한 IgA로 RID 측정법에 필요한 표준곡선을 작성한 바, 測定의 敏感度 (0.01 mg/mL)는 높았으며 diffusion 소요 시간을 48시간으로 설정할 경우, 測定에 대한 再現度 ($R^2 = 0.992$)도 매우 높게 나타나 표준곡선에 대한 양호한 회귀 방정식을 얻었다.
3. 혈청중 IgA 농도의 변화상은 1일령(0.42 mg/mL)부터 다소 감소하여 7일령(0.17 mg/mL)에는 최저수준을 보였으며, 그 이후 부터는 점차적으로 증가하여 6주령부터는 2.7 mg/mL의 수준으로 유지되었다. 성별에 따른 혈청 IgA 농도수준 간에는 차이가 없었다.

인용문헌

- Benedict AA 1967 Production and purification of chicken immunoglobulins. In "Methods in immunology and immuno-chemistry." Vol I, edited by CA Williams and MW Chase, Pages 229-237 Academic Press, New York and London.
- Bienenstock J, Parey DYE, Gaukdi J, Underdown BJ 1973 Chicken gamma A: physicochemical and immunochemical characteristics. J Immunol 110:524-533.
- Higgins DA 1975 Physical and chemical properties of fowl immunoglobulins. The Vet Bull 45:139-154.
- Kincade PW, Cooper DW 1973 Immunoglobulin A: Site and sequence of expression in developing chicks. Science 179, 398-400.
- Lebacqz-Verheyden AML, Vaerman JP, Heremans JF 1974 Quantification and distribution of chicken immunoglobulins IgA, IgM and IgG in serum and secretions. Immunol 27:683-692.
- Leslie GA, Martin LN 1973 Studies on the secretory immunologic system of fowl. II. Serum and secretory IgA of the chicken. J Immunol 110: 1-9.
- Leslie GA, Clem LW 1969 Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. J Exp Med 130:1337-1352.
- Mancini G, Carbonara VA, Heremans JF 1965. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry 2:235-254.
- Rammensee M 1984 Immunoglobulin konzentrationen in Serum, Sekreten, Ei und Embryo des Haushuhns. Diss Med Vet, München.
- Schraener I, Dorn W, Loesch U 1987 Quantification of monomeric and polymeric IgM and IgA in chicken serum. J Vet Med B 34:407-420.
- Wang AC, Fudenberg HH 1974 IgA and evolution of immunoglobulins. J Immunogenetics 1: 3-31.
- 김정우 이진연 김춘수 김상희 박근식 1993 육용계의 혈청중 면역글로부린(IgA, IgG, IgM) 농도의 발육시기별 변화상. I. 혈청 IgG의 분리 및 발육시기별 농도 수준. 한국가금학회지 20(2):65-72.