

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

## III. IgM 분리 및 발육시기별 농도수준

김정우 · 이민호 · 김춘수 · 김상희<sup>1</sup> · 박근식<sup>1</sup>

단국대학교 축산학과

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

### III. Isolation of IgM and Developmental Changes of Serum IgM Levels

J. W. Kim, M. H. Lee, C. S. Kim, S. H. Kim<sup>1</sup> and K. S. Park<sup>1</sup>

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 IgM and to profile the developmental changes of serum IgM 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, three days of age, and weekly thereafter till to 7 weeks of age. The pure IgM was isolated from ammonium sulfate treated chicken serum by both sephadex G-200 and sepharose CL-6B chromatography. The breaking-through peak containing IgM appeared from the fraction 26 to 28. These fractions consisted mainly of IgM when tested by anti-chicken IgM(Nordic, Netherlands). Immunized with the heavy chain of this purified IgM, the rabbit immune sera(anti-chicken IgM) were formed a reaction only with the purified chicken IgM. The quantitative assay of serum IgM were carried by RID method. The optimal time for diffusion was 14 hours and the coefficient of determination(R<sup>2</sup>) for regression equation of standard curve was 0.992. It was observed that IgM concentrations were the highest at hatching(3.23 mg /mL), after that decreased gradually. From 2 to 5 weeks of age the levels unchanged(2.0 ~ 2.3 mg /mL), and gradually decreased to 7 weeks of age(1.3 mg /mL).

(Key words: IgM purification, IgM concentration, broiler chicks,)

### 서론

가금류에서의 공인된 면역글로부린의 종류는 immunoglobulin G (IgG), immunoglobulin A(IgA),

와 immunoglobulin M (IgM)의 3가지로 명명되고 있으며, 이들은 포유동물의 IgG, IgA, 와 IgM과 생물학적 특성이 유사하다(Higgins, 1975).

가금류의 IgM은 포유류의 IgM과 형태학적 기본구조가 같다. 총 5 개의 분자단위(molecular unit)로 구

본 연구는 과학 기술처의 특정연구개발 사업연구비(1992) 지원으로 수행되었음.

<sup>1</sup>가축위생연구소 (Veterinary Research Institute, RDA)

성되어 있으며 각각의 분자단위는 2개씩의 heavy chain과 light chain으로 구성되어 있다. IgM의 분자량은 823,000~954,000 정도이며 흡광계수(extinction coefficient)는 280 nm에서 12.52~12.72 범위로서 측정방법에 따라 다소간 차이가 있다. 침전계수(sedimentation coefficient)도 연구자에 따라 11.9~28 범위로 차이가 심한 것으로 보고되었다(Leslie와 Clem, 1969; Heyward *et al.*, 1972; Benedict, 1967a). 면역전기영동에 대한 移動度는 사람의 IgM의 경우와 유사하다(Tureen *et al.*, 1966).

가금의 혈청으로부터 IgM의 분리는  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  로 침전시킨 후 이를 gel filtration 법에 의하여 얻을 수 있는 방법(Leslie와 Benedict, 1967b; Leslie와 Clem, 1969; Heyward *et al.*, 1972)과 DEAE-cellulose colum에서 높은 중량농도(molarity)와 pH 조건하에서 혈청단백으로부터 용출시키는 방법(Benedict *et al.*, 1963; Szenberg *et al.*, 1965) 등이 소개되었다. 닭혈청에서 IgM을 분리할 경우, 혈청중 IgM의 농도가 매우 낮기 때문에 IgM의 회수량은 매우 소량으로 보고되고 있다.

닭은 외부로부터 침입된 모든 항원에 대한 면역반응의 일차적 성분으로 IgM 항체를 생산한다. IgG는 가용성 단백질에 대하여 면역반응을 일으키는 반면에 IgM은 특히 virus, bacteria와 erythrocytes와 같은 미립자 항원들에 대하여 면역반응을 일으킨다(Szenberg *et al.*, 1965). 따라서 IgM은 이형 적혈구에 응집하는 항체의 주성분이며 단백질항체에 대한 indirect haemagglutination test에서 가장 활성화된 면역글로부린이다(Dreesman *et al.*, 1965).

닭의 혈청중 IgM의 평균 농도는 연구자들 간에 다소간의 차이를 보이고 있다. 산란성계의 경우 0.71 mg/mL ~ 2.64 mg/mL 수준이며 중추(4~6개월령)는 1.20 mg/mL ~ 4.6 mg/mL 수준으로 보고하였다. 그리고 부화 후부터 4일령까지의 초생추의 혈청중에는 IgG만 발견되며 4일령 이후부터 IgM이, 그리고 10~12일령부터 IgA가 발견된다(Leslie와 Clem, 1970; Leslie와 Martin, 1973; Lebacq-Verheyden *et al.*, 1974; Schraener *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1980). 한편 Cho(1970)는 부화 직후 초생추의 혈청중 IgM농도는 정밀한 측정방법에 의해 측

정한 결과 미량이 존재한다고 주장하는 반면에 일부 연구자들은 IgM 함량이 없다고 보고하고 있다(Rammensee, 1984; Juergens, 1987). 이와같이 닭의 혈청중 IgM의 농도 수준에 관한 연구결과는 연구자들 간에 아직도 일치하지 않는 실정이다. 상기의 결과들은 대부분 산란계를 대상으로 한 단편적인 연구로서 사육 전기간을 대상으로 조사된 포괄적인 연구사례는 아직 미흡한 실정이다. 특히 육용계를 대상으로 사육 전기간동안의 혈중 IgM농도 변화에 대하여 구체적으로 연구된 보고사례는 접할 수가 없다.

따라서 본 연구는 일차적으로 혈청 IgM의 함량측정법을 정립하기 위하여 순수한 IgM과 면역혈청(anti-IgM)을 자체생산하고, 이를 이용하여 건강한 육용계에서 혈청중 IgM 농도의 주령별 수준변화에 대한 profile 을 설정함으로써 육용계의 IgM 수준과 관련된 제반 연구에 활용할 수 있는 기초자료를 제공하고 자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. IgM의 순수분리 및 동정

IgM 은 성계의 혈청(chicken serum)으로부터 Rammensee (1984)와 Leslie 등(1969, 1973)이 실시한 방법을 일부 수정하여 Figure 1에서와 같이 gel filtration법(sephadex G200, CL sepharose 6B)을 순차적으로 이용하여 분리하였다.

### 2. 항혈청(Anti-IgM)의 대량생산

닭의 혈청으로부터 분리된 순수 IgM분자의 heavy chain을 Coligan 등(1991)의 방법에 의하여 분리하고 이를 항원으로 김정우 등(1993)의 방법에 의거 토끼에 면역시켜 닭의 IgM에 대한 항혈청(anti-IgM)을 생산하였다.

### 3. 혈청중 IgM의 양적측정 방법

혈청IgM의 농도측정은 Mancini 등(1965)에 의해 개발된 single radial immuno diffusion test (RID-test)를 이용하였다. 생산된 항혈청의 IgM에 대한 역가를 결정된 후 이를 1.5% agar 용액에 혼합하여 antibody agar plate 를 제조하였다.

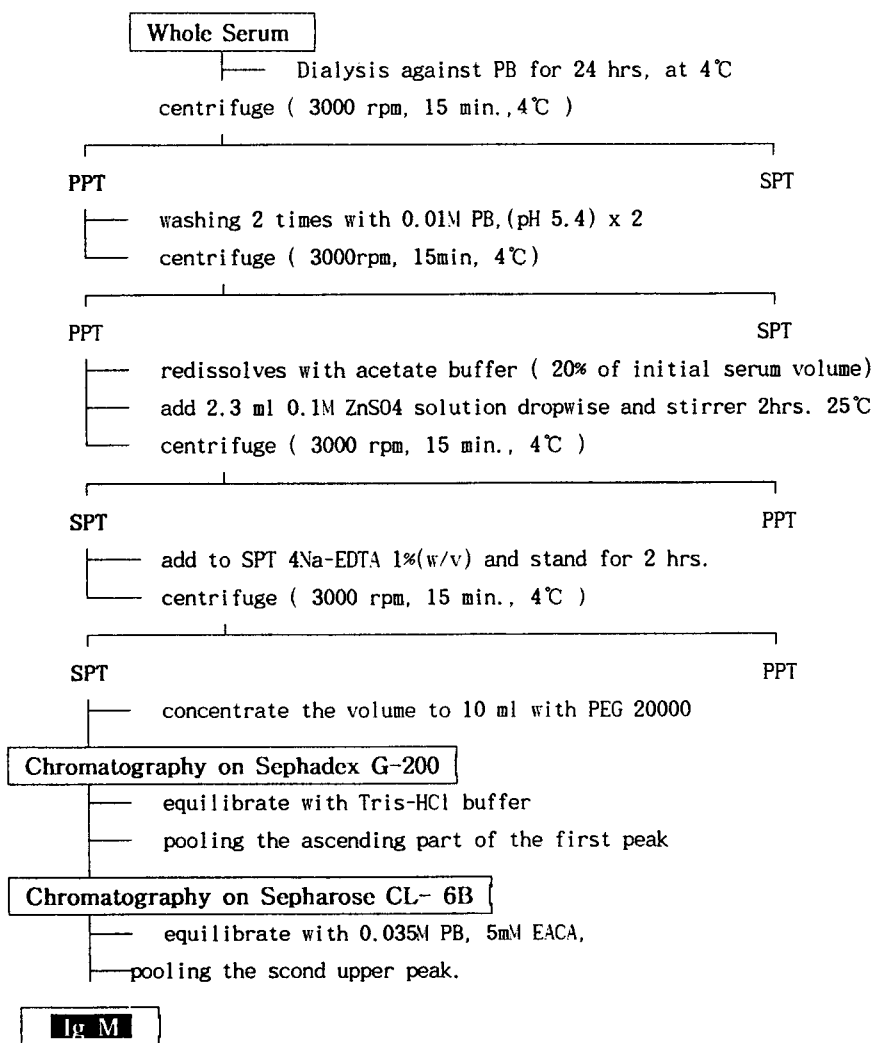


Figure 1. Purification procedure for IgM from chicken serum.

IgM standard는 1.6mg/mL, 0.8mg/mL, 0.4mg/mL, 0.25mg/mL, 0.13mg/mL 로 표준농도를 작성하여 사용하였고, humidity chamber에서 diffusion시켜 antigen(IgM) 과 antibody(anti-IgM)의 최적 반응시간을 결정하고 이를 이용하여 sample의 IgM 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 첨가배합은 배제하여 생후부터 6주 내지 7주 까지 단국대학교 농과대학 실험축사에서 cage 사육방법으로 사육하였으며 기타 일반적인 사양관리는 관례에 의거 실시하였다.

혈액은 1일령, 3일령, 1주령, 11일령, 2주령, 3주령 에는 심장에서 채취 하였으며, 4주령, 5주령, 6주령, 7

주령에서는 날개의 정맥으로부터 1 mL를 채혈한 후, 3,000 rpm (2,000 g), 4℃에서 30분간 원심분리하여 혈청을 취한후 -20℃에서 보관하면서 IgM 농도측정에 이용하였다.

전 사육기간 동안 IgM 농도를 측정하였으며 통계 처리는 SAS program package의 "GLM" program을 이용하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. IgM의 순수분리 및 동정

Sephadex G200 column으로부터 용출(elution)된 분획들의 optical density를 U.V. spectrophotometer(280 nm)로 측정한 결과 Figure 2에 나타난 바와 같이 2개의 peak로 형성되었다. 분획된 용액중 첫번째 peak의 전반부위에 해당하는 지역의 분획들을 합쳐서 농축시킨 후 double immunodiffusion test에 의해 특이성(specificity)을 조사해본 결과 IgM과 IgG가 혼합되어 있는것으로 나타났으며(Figure 4), 이를 다시 CL-sepharose 6B column을 통하여 용출시킨 결과 하나의 peak를 형성하였다(Figure 3). 이 peak에 해당되는 분획들의 항원특이성을 조사한 결과 순수한 IgM으로 판명되었다(Figure 4).

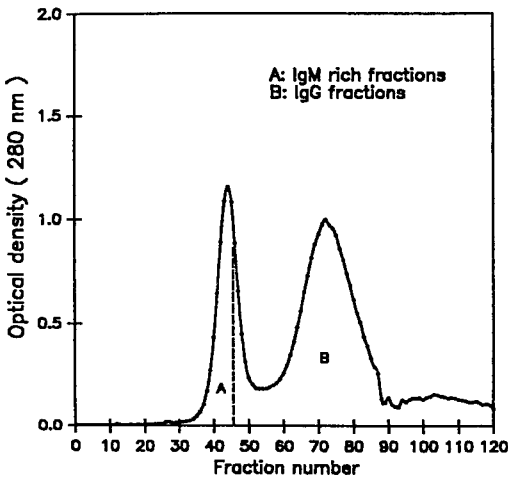


Figure 2. Gel filtration chromatography of whole chicken serum on Sephadex G200.

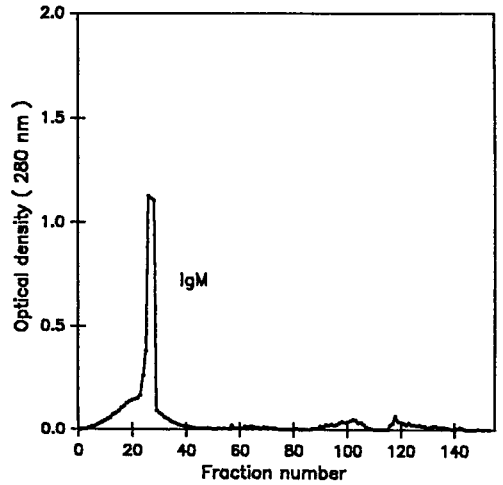


Figure 3. Gel filtration on CL Sepharose 6B of Ig fraction obtained from the Sephadex G200 column.

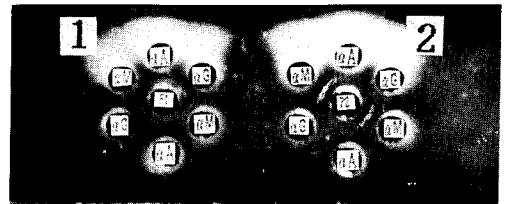
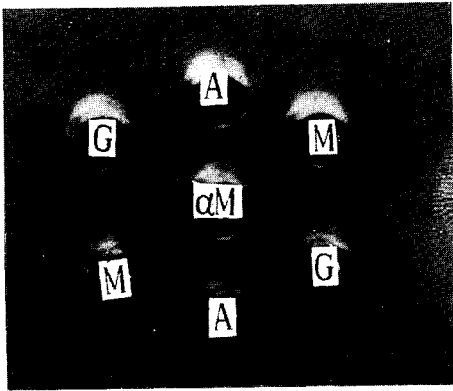


Figure 4. Ouchterlony analysis of purified chicken IgM.

- 1 : fractions from gel filtration on Sephadex G-200 column.  
(cross reaction with anti-chicken IgG)
- 2 : fractions from rechromatography on Sepharose CL-6B column.  
aA: anti-IgA, G: anti-IgG, aM: anti-IgM

#### 2. 항혈청의 생산 및 특이성

닭의 혈청으로부터 분리된 순수 IgM의 heavy chain을 면역원으로 하여 김정우 등(1993)의 방법에 의거 토끼에 면역시켜 닭의 IgM에 대한 항혈청(rab-



**Figure 5.** Ouchterlony analysis of antiserum against chicken IgM.  
 αM: antiserum against chicken IgM  
 A: Chicken IgA, G: Chicken IgG, M: Chicken IgM.

bitanti-chicken IgM)을 생산하였다. 생산된 항혈청에 대한 항체의 특이성을 조사한 바, Figure 5에 제시된 바와 같이 생산된 항혈청은 IgM 항원에만 특이적으로 반응하였다.

**3. 정량측정방법의 재현도**

닭의 혈청중 IgM 농도의 정량측정은 RID(radial immunodiffusion test) 측정법에 의거 실시하였다. 각각의 표준항원(standard IgM)과 항체와의 diffusion 반응결과를 측정하여 작성한 농도를 square root로 변환하고, 이들을 반응소요시간 별로 표준곡선(standard curve)을 작성한 바, 14시간에서 가장 양호하게 나타났으며 회귀방정식에 대한 결정계수(R<sup>2</sup>)

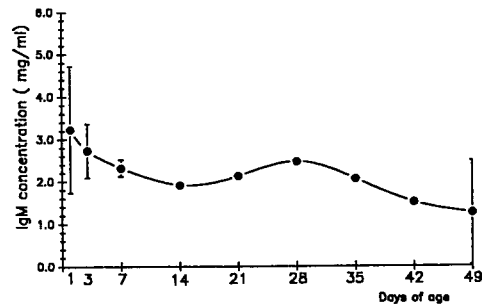
는 0.992로서 높은 재현도를 보였다(Table 1).

IgM의 양적측정방법에서 precipitation line의 선명도 증대하기 위하여 Agarnoble 배지 대신에 Agarose Type II를 사용할 경우 더욱 효과적인 결과를 얻었다.

**4. 혈청중 IgM 농도수준의 발육시기별 변화**

혈청 IgM의 발육시기별 수준변화를 보면, 부화후 1일경(3.23 mg/mL)부터 서서히 감소하여 2주령에서 2.0 mg/mL의 수준을 보이다가 일시적으로 증가되어 4주령에서 2.3 mg/mL 수준에 도달하였다. 그 이후는 다시 감소되어 7주령에서는 전 사육기간중 최저의 수준(1.2 mg/mL)으로 나타났다(Figure 6).

본 실험의 결과에서 부화직후의 상대적으로 높은 IgM 농도는 여러 연구자들의 결과와 상치되는 결과이며, 농도의 수준에 차이는 있으나 Cho(1970)의 결과와는 유사한 것으로 나타났다.



**Figure 6.** Developmental changes of serum IgM concentration in broiler chicks during the experimental period.

**Table 1.** Regression equation of standard curve on IgM and their coefficient of determination(R<sup>2</sup>) at different time of reading intervals

Diffusion time (h)	Regression equation of standard curve (SQR(Y)= a + bX)	R <sup>2</sup> value
8	SQR(Y)= -2.2234 + 0.6762 X	0.979
10	SQR(Y)= -2.2247 + 0.6143 X	0.980
12	SQR(Y)= -1.6194 + 0.4810 X	0.984
14	SQR(Y)= -1.5651 + 0.4678 X	0.992
16	SQR(Y)= -1.5651 + 0.4678 X	0.992

이 차이는 본 실험의 성격상 구체적인 원인규명은 불가능하나, 대부분의 연구자들은 산란계를 대상으로 한 결과인데 비하여 본 실험에서는 vaccine 투여를 전혀 하지않은 육계를 대상으로 조사하였고 또한 사육 전기간중 모든 항생제 및 촉진제의 첨가를 배제한 사료를 급여함으로 인한 유전적 및 환경적 차이로 발생한 것으로 추정된다. 또한 최근에는 저농도의 수준까지 정밀하게 측정할 수 있는 면역측정법의 발달로 인하여 미량의 함량까지 측정이 가능함으로 인한 차이 등으로 생각된다.

이 기간중 성별에 따른 IgM의 농도는 유의차가 없는 것으로 나타났다. 1주령에서 3주령까지의 IgM의 농도는 수컷에 비하여 암컷이 약간 높은 수준을 보였으며 수컷의 IgM 농도는 7일령에서 가장 낮은 수준에 도달한 반면에 암컷의 경우에는 14일령에 가장 낮은 수준에 도달하였다. 이는 수컷의 능동면역 체계가 암컷보다 조기에 발달되어 IgM의 자체생산이 7일령 이후부터 이루어지는 것으로 추정된다(Table 2).

특기할 만한 현상은 IgG의 혈중 농도 수준은 각각 1주령 및 2주령 이후 부터 서서히 증가되는 현상을 보이고 있는데 비하여(김정우 등, 1993) IgM의 수준은 2주령 이후 일시적인 증가 현상은 있으나 전 사육기간 동안 점차적인 감소 현상을 보이고 있다. 이와 같은 현상은 IgG에 대한 능동 면역 기전의 발달이 IgM보다 조기에 이루어 지는 것으로 추정된다.

## 적 요

본 실험은 닭의 혈청으로부터 IgM를 순수분리하고 이에 대한 항혈청을 대량 생산하여 IgM의 양적측정에 필요한 물질의 생산방법을 자체 정립하고, 아울러 육계의 전사육기간 동안의 혈청중 IgM 농도를 측정함으로써 닭의 IgM 수준변화에 대한 기초적인 자료를 제공하고자 실시하였다.

1. 닭의 혈청으로부터 sephadex G200 과 sepharose CL-6B chromatography 를 사용하여 순수한 IgM을 분리하였다. 분리한 IgM 분자의 heavy chain을 항원으로 토끼에 면역시켜 IgM에만 특이적으로 반응하는 항혈청(rabbit anti-chicken IgM)을 생산 하였다.
2. 표준항원(IgM)에 대한 항체(anti-IgM)와의 diffusion상태를 측정하여 표준곡선을 작성 한바, diffusion 소요시간이 14시간 에서 가장 양호한 회귀직선방정식을 얻었으며 결정계수(R<sup>2</sup>)는 0.992로서 측정에 대한 재현도가 높았다.
3. 혈청중 IgM의 농도의 변화상은 1일령에서(3.23 mg/mL) 가장 높 았으며 그 이후 서서히 감소하였다. 2주 ~ 4주령에는 일정 수준 (2.0 mg ~ 2.3 mg/mL)으로 유지되다가 그 이후 계속적으로 감소 하여 7주령시에는 최저의 수준인 1.3 mg/mL의 수준을 보였다. 성별에 따른 혈청

**Table 2.** Changes of serum IgM level in broiler chicks during the experimental period

Days of Age	IgM Concentration					
	n	Female mg/mL	n	Male mg/mL	n	Total mg/mL
Day 1	20	4.31 ± 0.203	20	4.18 ± 0.203	40	3.23 ± 1.492
Day 3	20	3.39 ± 0.203	20	2.77 ± 0.203	40	2.73 ± 0.637
Day 7	22	1.09 ± 0.351	22	0.90 ± 0.210	44	2.32 ± 0.203
Day 14	24	0.71 ± 0.337	24	1.04 ± 0.531	48	1.91 ± 0.138
Day 21	26	0.96 ± 0.357	24	1.01 ± 0.457	50	2.13 ± 0.135
Day 28	22	1.70 ± 0.640	26	1.89 ± 1.100	48	2.47 ± 0.113
Day 35	26	1.79 ± 0.646	28	1.57 ± 0.409	54	2.06 ± 0.135
Day 42	20	2.00 ± 0.531	20	2.12 ± 0.504	40	1.51 ± 0.133
Day 49	28	2.41 ± 0.557	24	2.55 ± 1.022	52	1.26 ± 1.221

<sup>1</sup>  $\bar{X} \pm SD$

IgM 농도수준 간에는 차이가 없었다.

### 인용문헌

- Benedict AA, Larson C, Nik-Kah H 1963 Synthesis of chicken antibodies of high and low molecular weight. *Science* 139: 1302-1303.
- Benedict AA 1967a Studies on chicken gamma M immuno- globulin. 7th Int Congr Biochem Tokyo, 797(Abstr).
- Benedict AA 1967b 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.
- Cho HC 1970 Immunosuppressive effects of york-transmitted antibodies in the young chick. Ph D Thesis, Univ Saskatchewan, Canada.
- Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shavach EM Strober W 1991 Current protocols in immunology. Unit 2. 9-2. 10. Purification of immunoglobulin M. 2. 9. 1-2. 10. 4., National Institutes of Health, USA.
- Dreesman G, Larson C, Pinckard RN, Groyon RM Benedict AA 1965 Antibody activity in different chicken globulins. *Proc Soc Exp Biol Med* 118:292-296.
- Heyward JT, Coleman MT Dowdle WR 1972 Influenza antihemagglutinin and antineuraminidase activity of IgG and IgM in reference chicken antisera. *Proc Soc Exp Biol Med* 140:1289-1293.
- Higgins DA 1975 Physical and chemical properties of fowl immunoglobulins. *The Vet Bull* 45:139-154.
- Juergens L 1987 Reinigung von IgG und IgG-Antikoerperern aus dem Eidotter und Bestimmung der Temperaturreistenz und Saeurenazitaet dieser Immunproteine. Diss Universitaet Muenchen.
- 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, Benedict AA 1969 Structural and antigenic relationship between avian immunoglobulins. I. The immune responses of pheasant and quail and reductive dissociation of their immunoglobulins. *J Immunol* 104:810-817.
- Leslie GA, Clem LW 1969 Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. *J Exp Med* 130:1337-1352.
- Leslie GA, Clem LW 1970 Chicken immunoglobulins: biological half-lives and normal adult serum concentration of IgM and IgY. *Proc Soc Exp Biol Med* 134:195-198.
- Leslie GA Martin LN 1973 Modulation of immunoglobulin ontogeny in chicken: effect of purified antibodies specific for  $\mu$  chain on IgM, IgY and IgA production. *J Immunol* 110:959-967.
- Mancini G, Carbonara VA Heremans JF 1965 Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 2:235-254.
- Rammensee M 1984 Immunoglobulinkonzentrationen in Serum, Sekreten, Ei und Embryo des Haushuhns Diss Med Vet, München.
- Smith EJ, Neumann U, Ikazaki, W 1980 Immune response to avian leukosis virus infection in chickens: sequential expressions of serum immunoglobulins and viral antibodies. *Comp Immunol Micro Infect Dis* 2:519-529.
- Schraener I, Dorn W, Loesch U 1987 Quantifi-

cation of monomeric and polymeric IgM and IgA in chicken serum. J Vet Med B 34:407-420.

Szenberg A, Lind P, Clarke K 1965 IgG and IgM antibodies in fowl serum. Aust J Exp Biol Med Sci 43:451-454.

Tureen LL, Warecka K, Young PA 1966 Immunophoretic evaluation of blood serum pro-

teins in chickens. I. Changing protein patterns in chickens according to age. Proc Soc Exp Biol Med 122:729-732.

김정우 이진언 김춘수 김상희 박근식 1993 육용계의 혈청중 면역글로부린(IgA, IgG, IgM) 농도의 발육시기별 변화상. I. 혈청 IgG의 분리 및 발육 시기별 농도 수준. 한국가금학회지 20(2):65-72.