

리베틴에 존재하는 난황항체의 소화효소에 대한 저항성

이 경 애

순천향대학교 식품영양학과

Resistance of Hen's Egg Yolk Immunoglobulins in Livetin to Digestive Enzymes

Kyong-Ae Lee

Dept. of Food Science and Nutrition, Soonchunhyang University, Asan 337-600, Korea

Abstract

A livetin solution(LS) containing yolk immunoglobulins(IgY) was separated by treating the egg yolk with natural gum, γ -carrageenan. γ -Carrageenan has been used as a food ingredient. Relative absorbance of IgY-LS after proteolysis was investigated. IgY-LS was fairly stable to pepsin digestion at pH 3.0. However, IgY-LS appeared to be susceptible to pepsin digestion at pH 2.0, showing 18% of relative absorbance and complete breakdown H chain after 30 min exposure. Relative absorbance of IgY-LS was considerably high after exposure to trypsin and chymotrypsin for 8 hr. IgY-LS showed especially good stability to chymotrypsin digestion.

Key words: IgY, egg yolk, livetin, digestive enzyme, stability

서 론

임상검사나 생화학 실험에 사용되는 특이항체는 주로 포유동물의 면역계를 이용하여 조제, 사용되고 있으나, 포유동물의 항혈청을 이용한 특이항체의 유도는 대량조제가 쉽지 않으며, 식품소재로 사용하기에는 비위생적이다.

닭의 혈액 중에 존재하는 세 종류의 면역글로블린(IgG, IgM 및 IgA) 중 IgG만이 달걀의 난황에 이행된다. 난황에 이행된 IgG는 아미노산 조성, 등전점, 친화성 등이 혈액 중의 IgG와 동일하여, 혈액 중 IgG는 특별한 수식이나 선택을 받지 않고 모든 population이 그대로 난황에 이행되는 것으로 생각되고 있다(1-3). 난황에는 IgG만이 고농도(약 1%)로 존재하므로, 1개의 달걀에서는 약 100~150mg의 crude IgG의 분리가 가능하다(4). 따라서 닭의 면역계를 이용하여 유도된 항체를 식품인 달걀의 난황에서 분리하는 항체 생산방법은 포유류의 항혈청을 이용하는 기존의 방법에 비해 저렴하고 위생적으로 대량조제할 수 있으므로, 난황은 매우 우수한 항체 공급원이다.

난황 IgG는 분자량, 등전점, 당의 함량, 포유류 보체(complement)의 활성화 능력, 프로테인 A 및 G와 결합하는 능력, 유전자 구조, domain 구조 등에서 포유류

IgG와는 다른 특성을 갖는다(5-9). 그러므로 Leslie와 Clem(10)은 포유류 IgG와 구별해서 IgY(Immunoglobulins in Yolk)로 명명하고 있다.

난황은 지질이 30%나 함유되어 있는 유화물로서 대부분의 단백질은 지단백질의 형태로 존재한다. 지질과 결합하지 않은 유리상태의 단백질은 수용성 단백질인 리베틴(livetin)으로 존재하는데, 리베틴은 α -, β -, γ -리베틴으로 나누어지며 이 중 γ -리베틴이 난황 IgG, 즉 IgY로 알려져 있다(11,12).

IgY는 포유류 IgG의 'potential substitute'로서 감염 방어, 면역연구용시약 등에서의 연구가 보고되어 있으며, 특히 수동면역을 위한 기능성 식품소재로의 활용이 기대되고 있다. IgY의 우수한 수동면역 효과에 대한 최근 연구로는 다음과 같은 것들이 보고되어 있다. Yolken 등(13)과 Ebina 등(14)은 IgY가 human 및 mouse rotavirus성 설사예방에 효과적이었다고 한다. Otake 등(15)과 Hamada 등(16)은 *Streptococcus mutans*에 대한 IgY가 우수한 충치예방의 효과를 나타냈다고 했으며, Yokoyama 등(17)은 어린돼지의 대장균성 설사예방에 IgY가 효과적이었다고 보고했다.

IgY의 경구투여가 수동면역 효과를 나타내기 위해 가장 중요한 것은 소화관 내에서의 안정성이다. 그러나 IgY는 강산에서의 안정성이 낮아 pH 3 이하에서 장시

간 반응시키면 구조적 변화를 일으켜 항원 결합력이 거의 소실되며 펩신에 대해 상당히 불안정하다고 한다(18). 산이나 펩신에 대한 안정성은 당 수용액 중에서 항상 되나 고농도(약 50%)의 당을 필요로 하므로 보편적으로 사용하기가 어려운 문제점이 있다(19). 한편 지금까지 수동면역소재로 사용되어 왔던 것은 포유동물의 초유, 초유에서 분리한 유청(whey), 항혈청에서 분리한 항체 등이다(20). McCallum 등(21)은 말의 초유에서 분리한 유청이 특이항체와 비슷한 수동면역 효과를 나타냈다고 했다. 따라서 천연검질인 γ -카라기난(carra-geenan)을 사용해서 저렴하고 손쉽게 분리될 수 있는 리베틴은 유청과 같이 우수한 수동면역 효과를 나타낼 것으로 생각되며, 존재하는 IgY는 공존하는 다른 단백질의 영향을 받아 분리, 정제된 IgY와는 다른 안정성을 나타낼 것으로 사료된다. 그러므로 본 연구는 리베틴의 소화효소에 대한 안정성을 검토하여 이를 수동면역소재로 이용할 수 있는 기초자료를 제공하고자 했다.

재료 및 방법

재료

β -락토글로불린(β -lactoglobulin, β -Lg, Sigma Co.)을 면역원으로 사용하여 닭(Isabrown, female)에 4회에 걸쳐 근육주사한 후, 산란된 달걀의 난황에 함유된 anti- β -Lg IgY를 분리하여 실험재료로 사용했다.

닭의 면역

β -Lg 용액(2mg/ml, in phosphate-buffered saline (pH 7.2, PBS))을 동량의 adjuvant와 혼합하여 emulsion을 조제한 후 1ml씩 2주 간격으로 4회에 걸쳐 닭에 근육주사했다. 초기면역에는 Freund's complete adjuvant (Difco Co.)를 사용했으며, 3회의 booster injection에는 Freund's incomplete adjuvant(Difco Co.)를 사용했다.

IgY의 분리

닭을 4회 면역시킨 후에 산란된 immune egg로부터 난황을 분리하여 Polson 등(22)의 방법에 따라 polyethylene glycol 6000을 사용해서 crude anti- β -Lg IgY (IgY-C)를 분리했다. 분리된 항체의 양은 280nm에서 흡광도(A)를 측정 한 후, $A^{1\%} = 13.8$ 에 의해 산출했다.

리베틴의 조제

리베틴은 Hatta 등(23)의 방법에 따라 조제했다. 분리한 난황 10ml에 증류수 10ml를 첨가하고, 다시 0.15

% γ -카라기난 수용액 40ml와 잘 혼합한 후, 실온에서 30분간 방치했다. 원심분리하여 IgY가 함유된 리베틴 용액(LS)인 상등액을 분리했다. LS중의 단백질 함량은 protein assay kit(Bio-Rad)를 사용하여 정량했다.

pH 안정성

0.01% LS의 pH를 HCl을 사용하여 pH 2~7로 조절했다. 각 pH에서 일정시간 반응시킨 후, 항체가 변화를 ELISA에 의해 측정했다.

소화효소에 의한 분해

0.1% LS(pH 2~3)에 펩신(Sigma Co.)을 1/100(w/w)의 비율로 첨가하여 0~4시간 반응시킨 후, PBS를 사용하여 펩신을 불활성화시켰다. 한편 LS(pH 8)에 트립신(Sigma Co.) 또는 키모트립신(Sigma Co.)을 1/100(w/w)의 비율로 첨가하여 0~8시간 반응시킨 후 phenylmethylsulfonyl fluoride를 사용하여 반응을 중지시켰다. LS를 각 효소로 분해시킨 후의 항체가 변화는 indirect ELISA에 의해 측정했다.

효소면역측정법(indirect ELISA)(24)

IgY의 활성은 indirect ELISA에 의해 측정했으며, 모든 반응은 실온에서 실시했다.

96 well microtiter plate(Nunc, Maxisorp)를 0.01% β -Lg 용액(in 50mM carbonate buffer, pH 9.6)을 100 μ /well 첨가하여 2시간 coating했다. 0.02% tween을 함유한 PBS(PBS-T)로 well을 씻은 후, PBS-T로 희석한 LS를 100 μ /well 첨가하여 2시간 반응시켰다. PBS-T로 well을 씻은 후, alkaline phosphatase rabbit anti-chicken IgG(H+L) conjugate(Sigma Co.)를 100 μ /well 첨가하여 2시간 반응시켰다. 다시 well을 씻은 후, 0.1% sodium p-nitrophenyl phosphate(in diethanolamine HCl buffer, pH 9.8)를 100 μ /well 첨가하여 30분간 반응시키고, 5N NaOH를 사용하여 반응을 정지시켰다. Microtiter plate reader(Bio-Rad)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정했다.

분리된 LS 중에 존재하는 IgY(IgY-LS)를 각 pH에서 반응시키거나 효소와 반응시킨 후, 다음과 같이 상대적 항체가(relative absorbance)를 산출했다.

상대적 항체가(%)=

$$\frac{\text{pH 처리 또는 효소 반응시킨 IgY-LS의 흡광도}}{\text{미변성(native) IgY-LS의 흡광도}} \times 100$$

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

SDS-PAGE는 Weber와 Osborn의 방법(25)에 따라 10% 또는 10~20% acrylamide gel을 사용해서 실시했다. 전기영동 후 0.01%(w/v) Coomassie brilliant blue R-250으로 염색했으며 10%(v/v) 초산용액으로 탈색했다.

결과 및 고찰

LS의 분자량

γ -카라기난을 사용해서 분리한 LS에는 약 0.3%의 리베틴이 함유되어 있었으며, 리베틴의 10% 정도가 IgY였다. IgY-LS는 ELISA에 의해 1~100 μ g/ml LS의 농도에서 검출할 수 있었다. LS의 SDS-PAGE 패턴을 Fig. 1에 나타냈다. LS는 α -리베틴(밴드 I), β -리베틴(밴드 III) 및 IgY(밴드 II, IV)가 함유된 분자량 14~70 kD에 속하는 단백질의 혼합물이었다. 밴드 II는 분자량 64kD 정도로서 IgY의 heavy chain이며, 밴드 IV는 분자량 25kD 정도로서 IgY의 light chain이었다.

산 안정성

IgY-LS를 pH 2~7에서 4시간 반응시킨 후, 상대적

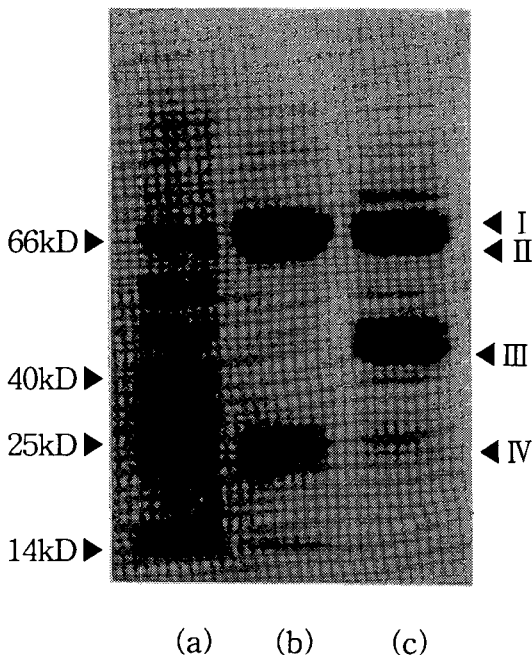


Fig. 1. Electrophoretic patterns of livetin separated with γ -carrageenan. (a) marker, (b) isolated IgY, (c) livetin

항체가를 측정하여 Fig. 2에 나타냈다. IgY-LS는 pH 5~7에서 상당히 안정했으며 pH가 4이하로 낮아짐에 따라 항체가가 조금 저하되었다. pH 2 및 pH 3에서 IgY-LS의 상대적 항체가는 각각 71%, 80%로서 비교적 높은 활성을 유지하고 있었다. pH 2~3에서의 항체가 변화를 반응시간에 따라 검토한 결과(Fig. 3), pH 2 및 pH 3에서 30분간 반응시킨 후의 상대적 항체가는 각각 80%, 87%였다. Lee(18)에 의하면 IgY-C의 안정성은 pH 2~3에서 30분 반응 후에 항체가가 50% 이상 저하되었고 4시간 반응 후에는 거의 활성을 나타내지 않았으며, pH 2에서 4시간 반응시킨 IgY는 β -sheet를 포함한 2차구조가 파괴되어 random coil을 형성한다고

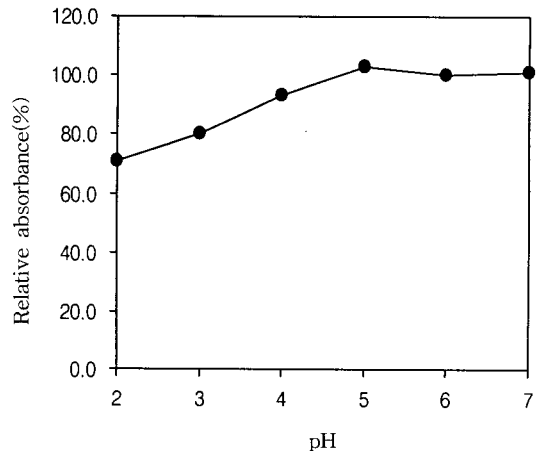


Fig. 2. Antibody activity of IgY-LS after incubating at different pHs. A LS solution was incubated for 4hr.

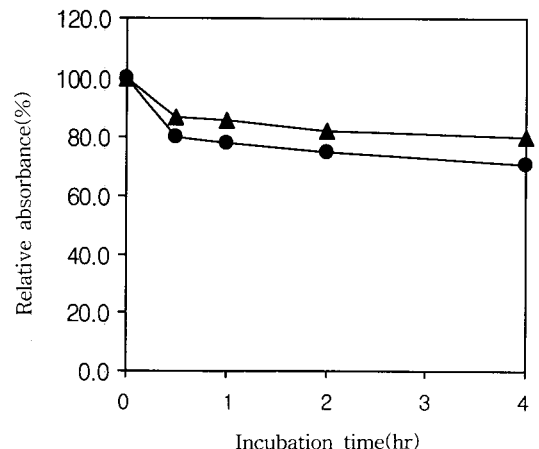


Fig. 3. Antibody activity of IgY-LS after incubating at acidic conditions. A LS solution was incubated at pH 2.0(●), or pH 3.0(▲).

했으나, IgY-LS는 IgY-C에 비해 pH 2~3에서 상당히 우수한 안정성을 나타냈다. Palmer 등(26)에 의하면 rabbit IgG는 산에 의해 Fc부분의 비공유결합이 파괴되었다. Dressman과 Benedict(27)는 IgY는 포유류 IgG에 비해 Glu, Tyr의 함량이 적어 이들 아미노산에 의해 형성되는 비공유결합이 약하다고 보고했다. 그러므로 IgY-LS의 높은 산 안정성은 LS 중에 공존하는 단백질 성분이 비공유결합의 절단에 따른 구조변화가 일어나지 않도록 IgY를 보호하기 때문으로 사료된다. Pavari 등(8)은 IgY의 H chain에는 hinge가 없고 포유류 IgG보다 1개 더 많은 4개의 constant domain이 존재한다고 했다. Hinge는 다양한 크기의 항원과 결합할 수 있도록 유연성을 부여하는 부분으로 작은 구조변화에 의해서도 항원결합력의 저하를 일으킬 수 있다.

소화효소에 대한 안정성

LS(pH 2~3)에 펩신을 첨가하여 0~4시간 반응시킨 후 상대적 항체가를 측정했다(Fig. 4). pH 3에서 반응시킨 IgY-LS의 상대적 항체가는 30분 반응 후에 79%, 2시간 반응 후에 76%, 4시간 반응 후에 74%로서 비교적 높은 활성을 유지하고 있어 펩신에 대해 큰 저항성을 보였다. pH 2에서 IgY-LS의 상대적 항체가는 30분 반응 후에 18%, 4시간 반응 후에는 8%로 거의 활성을 나타내지 않았다. Lee(19)에 의하면 IgY-C는 pH 2에서 펩신과 30분간 반응시킨 후 항원 결합력이 거의 소실되었다. 따라서 IgY-LS의 펩신에 대한 저항성은 IgY-C에 비해 조금 큰 것으로 생각된다. 특히 pH 3에서 IgY-LS는 IgY-C에 비해 펩신에 대해 큰 저항성을 나타내어(data not shown), IgY-LS를 우수한 수동면

역소재로 사료된다. 펩신 분해시킨 IgY-LS의 SDS-PAGE 패턴을 10~20% acryamide gel을 사용하여 검토하여 Fig. 5에 나타냈다. pH 2에서는 30분 반응 후에 IgY의 H chain이 전부 분해되었으며 α - 및 β -리베틴도 상당히 분해되어 분자량 14~40kD 정도의 분해물이 생성되었다. 4시간 반응 후에는 IgY의 L chain도 거의 분해되었으며 분자량 14kD 정도의 분해물이 생성되었다. 펩신에 대해 큰 저항성을 나타내는 pH 3에서는 H chain의 변화가 거의 나타나지 않았으므로, pH 2에서 펩신 분해에 의한 급격한 항체가의 저하는 H chain의 분해와 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다. Leslie와 Benedict(28)에 의하면 닭의 γ -글로블린(IgY)은 펩신 분해(pH 5, 18 hr)에 의해 IgY의 일부가 분해되어 항원결합 부위인 Fab가 생성된다고 한다. 본 실험과 반응 조건이 다르므로 비교하기는 어려우나 pH 2에서 IgY는 Fab 부분에 상당한 변화를 일으켜 항원결합력이 상실된 것으로 사료된다.

IgY-LS를 트립신 또는 키모트립신으로 분해시킨 후의 상대적 항체가를 측정했다(Fig. 6). IgY-LS는 트립신과 4시간, 8시간 반응시킨 후의 상대적 항체가는 각각 90%, 72%였으며, 키모트립신과 4시간, 8시간 반응시킨 후의 상대적 항체가는 각각 90%, 85%였으므로

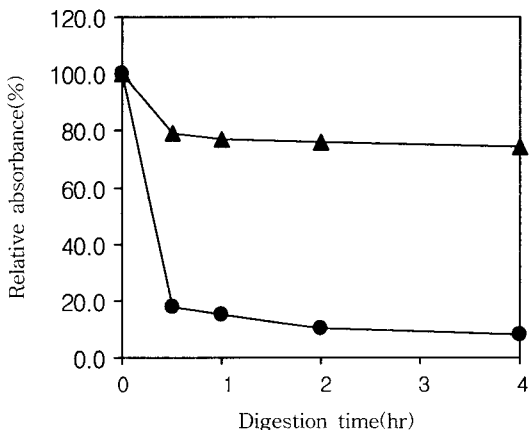


Fig. 4. Antibody activity of pepsin digested IgY-LS. A LS solution was digested with pepsin at pH 2.0 (●), or pH 3.0(▲).

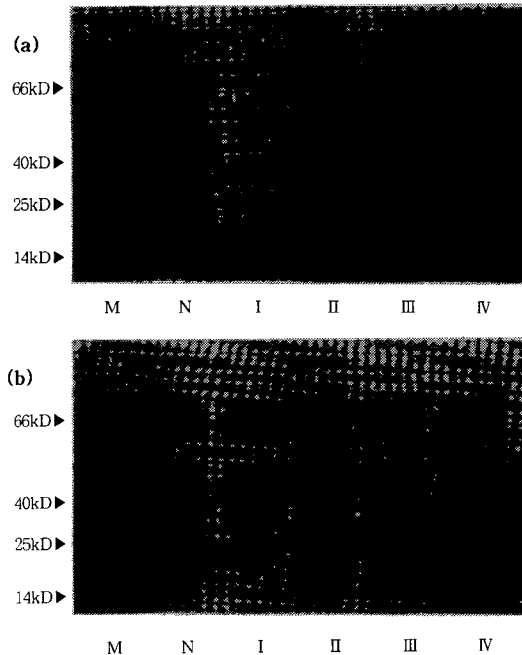


Fig. 5. Electrophoretic patterns of livetin digested with pepsin at pH 2(a), or pH 3(b). M: marker, N: native livetin, I: digestion for 30 min, II: digestion for 1 hr, III: digestion for 2 hr, IV: digestion for 4 hr

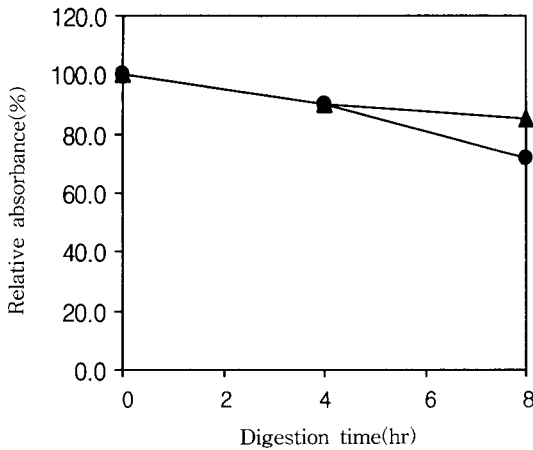


Fig. 6. Antibody activity of IgY-LS digested with trypsin(●), or chymotrypsin(▲). A LS solution was digested at pH 8.0.

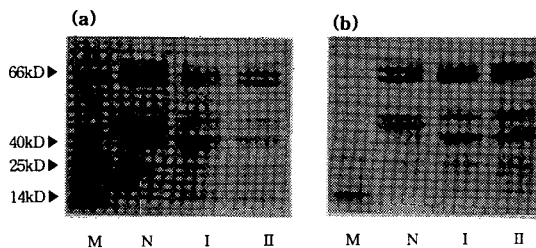


Fig. 7. Electrophoretic patterns of livetin digested with trypsin(a), or chymotrypsin(b). M: marker, N: native livetin, I: digestion for 4 hr, II: digestion for 8 hr

IgY-LS는 트립신 및 키모트립신 분해에 매우 안정함을 알 수 있었다. 트립신 또는 키모트립신을 IgY-LS와 1:1로 반응시켰을 때, 트립신과 반응시킨 IgY-LS는 활성을 나타내지 않았으나, 키모트립신과 반응시킨 IgY-LS는 50% 정도의 상대적 항체가를 나타냈으므로(data not shown) 키모트립신의 작용에 대해 상당히 안정한 것으로 사료된다. 트립신 및 키모트립신과 반응시킨 IgY-LS의 SDS-PAGE 패턴을 10~20% acrylamide gel을 사용하여 검토했다(Fig. 7). 트립신과 반응시킨 IgY-LS는 H chain이 조금 분해되었으나(Fig. 7(a)), 키모트립신과 반응시킨 IgY-LS는 H chain 및 L chain에 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 7(b)). 한편 β -리베틴은 두 효소에 의해 작용에 상당히 불안정하여 거의 분해되었다.

요 약

IgY가 함유된 리베틴 용액(LS)을 조제하여 LS에 존

재하는 IgY(IgY-LS)의 산 및 소화효소에 대한 안정성을 검토했다. IgY-LS를 pH 2 및 pH 3에서 4시간 반응시킨 후의 상대적 항체가는 각각 71%, 80%로서 강산에서 안정성이 매우 좋았으며, IgY-C에 비해 강산에서의 저항성이 매우 향상되었다. IgY-LS를 pH 3 및 pH 2에서 펩신과 30분 반응시킨 후의 상대적 항체가는 각각 79%, 18%로서 IgY-C에 비해 상당히 안정했다. 펩신으로 분해시킨 IgY-LS의 SDS-PAGE 패턴에 의하면 H chain이 거의 분해되어 펩신의 작용에 민감한 부분은 H chain으로, 이 부분이 활성 저하와 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다. 한편 IgY-LS를 트립신 및 키모트립신과 8시간 반응시킨 후의 상대적 항체가는 각각 72%, 85%로서 높은 저항성을 보였으며, SDS-PAGE 패턴에도 큰 변화가 보이지 않았으므로 IgY-C와 같이 이들 효소에 대해서는 상당히 안정한 것으로 사료되며 특히 키모트립신의 작용에 대해 높은 안정성을 나타냈다. 그러므로 IgY-LS의 강산 및 펩신에 대한 안정성 향상은 수동면역소재로 IgY의 이용도를 증가시킬 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 한국학술진흥재단의 공모과제에 의해 수행된 연구 결과의 일부이며, 연구비를 지원해 준 학술진흥재단에 깊은 감사를 드립니다.

문 헌

- Rose, M. E., Orlands, E. and Buttress, N. : Immunoglobulin classes in the hen's egg : their segregation in yolk and white. *Eur. J. Immunol.*, **4**, 521-523(1974)
- Bar-Joseph, M. and Malkinson, M. : Hen egg yolk as a source of anti-viral antibodies in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a comparison of two plant virus. *J. Virol. Methods*, **1**, 179-183(1980)
- Rose, M. E. and Orlands, E. : Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick. *Dev. Comp. Immunol.*, **5**, 15-20(1981)
- Lösch, U., Schräner, I., Wanke, R. and Jurgens, L. : The chicken egg, an antibody source. *J. Vet. Med. B*, **33**, 609-619(1988)
- Higgins, D. A. : Physical and chemical properties of fowl immunoglobulins. *Vet. Bull.*, **45**, 139-150(1975)
- Benedict, A. A. : Immunoglobulin characteristics : chicken, in inbred and genetically defined strains of laboratory animals. part 2, Biological handbooks III, pp.658-661(1979)
- Reynaud, C-A., Dahan, A., Anquez, V. and Weill, J-C. : Somatic hyperconversion diversifies the single VH gene of the chicken with a high incidence in the D region. *Cell*, **59**, 171-183(1989)

8. Parvari, R., Avivi, A., Lentner, F., Ziv, E., Tel-Or, S., Burstein, Y. and Schechter, I. : Chicken immunoglobulin G-heavy chains : limited VH gene repertoire, combinational diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus. *EMBO J.*, **7**, 739-744(1989)
9. Thompson, C. B. and Neiman, P. E. : Somatic diversification of the chicken immunoglobulins light chain gene is limited to the rearranged variable gene segment. *Cell*, **48**, 369-378(1987)
10. Leslie, G. A. and Clem, L. W. : Phylogeny of immunoglobulin structure and function : Immunoglobulins of the chicken. *J. Exp. Med.*, **130**, 1337-1352(1969)
11. Martin, G. W., Vandergaer, J. E. and Cook, W. H. : Fractionation of livetin and other molecular weights of the α - and β -components. *Can. J. Biochem. Phys.*, **35**, 241-250(1957)
12. Hatta, H., Sim, J. S. and Nakai, S. : Separation of phospholipids from egg yolk and recovery of water-soluble proteins. *J. Food Sci.*, **53**, 425-427(1988)
13. Yolken, R. H., Leister, F., Wee, S-B., Miscuff, R. and Vonderfecht, S. : Antibodies to rotaviruses in chicken's egg: A potential source of anti-viral immunoglobulins suitable for human consumption. *Pediatrics*, **81**, 291-295(1988)
14. Ebina, T., Tsukada, K., Umezu, K., Nose, M., Tsuda, K., Hatta, H., Kim, M. and Yamamoto, T. : Gastroenteritis in suckling mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin and treated with a protein-bound polysaccharide preparation. *Microbiol. Immunol.*, **34**, 617-629(1990)
15. Otake, S., Nishihara, Y., Makimura, M., Hatta, H., Kim, M. and Yamamoto, T. : Protection of rats against dental caries by passive immunization with hen-egg yolk antibodies. *Dent. Res.*, **70**, 162-166(1991)
16. Hamada, S., Horikoshi, T., Minami, T., Kawabata, S., Hiraoka, J., Fujiwara, T. and Ooshima, T. : Oral passive immunization against dental caries in rats by use of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, **59**, 4161-4167(1991)
17. Yokoyama, H., Peralta, C., Diaz, R., Sendo, S., Ikemori, Y. and Kodama, Y. : Passive protection of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infect. Immunol.*, **60**, 998-1007(1992)
18. Lee, K. A. : Studies on the stability of hen's egg yolk immunoglobulins. *Korean J. Soc. Food Sci.*, **12**, 54-59(1996)
19. Lee, K. A. : Changes of antigen binding activities of hen's egg yolk immunoglobulins after proteolysis. *Korean J. Soc. Food Sci.*, **13**, 168-172(1997)
20. Tacket, C. O., Losonsky, G., Link, H., Hoang, Y., Guesry, P., Hilpert, H. and Levine, M. M. : Protection by milk immunoglobulin concentrate against oral challenge with enterotoxigenic *E. Coli*. *N. Engl. J. Med.*, **318**, 1240-1243(1988)
21. McCallum, I. M., Elliot, J. I. and Owen, B. D. : Survival of colostrum-deprived neonatal piglets fed gamma-globulins. *Can. J. Anim. Sci.*, **57**, 151-155(1977)
22. Polson, A., Von Wetchmar, B. and Fazakerly, G. : Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol. Commun.*, **9**, 475-493(1980)
23. Hatta, H., Kim, M. and Yamamoto, T. : A novel method for hen egg yolk antibody, "IgY". *Agri. Biol. Chem.*, **54**, 2531-2535(1990)
24. Engvall, E. and Perlmann, P. : Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. First international symposium on immunoenzymatic technique INSERIM symposium No. 2., pp.135-139(1976)
25. Weber, K. and Osborn, M. : The reliability of molecular weight determined by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412(1969)
26. Palmer, J. L., Nisonoff, A. and Holde, K. E. V. : Dissociation of rabbit gamma globulin into subunits by reduction and acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **50**, 314-321(1963)
27. Dressman, G. R. and Benedict, A. A. : Reductive dissociation of chicken γ G immunoglobulin in neutral solvents without a dispersing agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 822-830(1965)
28. Leslie, G. A. and Benedict, A. A. : Structural and antigenic relationship between avian immunoglobulins II. Properties of papain- and pepsin-digested chicken, pheasant and quail IgG-immunoglobulins. *J. Immunol.*, **104**, 810-817(1970)

(1999년 1월 20일 접수)