

육용계의 혈청중 면역글로불린(IgA, IgG, IgM) 농도의 발육시기별 변화상

I. 혈청 IgG의 분리 및 발육시기별 농도 수준*

김정우 · 이진언 · 김춘수 · 김상희* · 박근식*

단국대학교 농과대학

(1993. 4. 30. 접수)

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

I. Isolation of IgG and Developmental Changes of Serum IgG Levels

J.W. Kim, J.E. Lee, C.S. Kim, K.S. Park* and S.H. Kim*

College of Agriculture, Dankook University

(Received April 30, 1993)

SUMMARY

The experiment was conducted to establish the large scale production of anti-serum against chicken IgG and to profile the developmental changes of serum IgG levels during all the feeding period(from hatching to 7 weeks of age) in broiler chicks.

Blood sample were taken from Hubbard chicken bi-daily or /and weekly during the experimental period.

The pure IgG was isolated from ammonium sulfate treated chicken serum by ion exchange chromatography. The quantitative assay of serum IgG were carried by RID method.

It was observed that IgG concentrations were showed the highest at hatching(4.25 mg /ml), after that decreased rapidly, lowest at 2 weeks of age(0.81 mg /ml), and gradually increased to 7 weeks of age(2.48 mg /ml)

There was no differences of IgG level between sex, but the IgG levels of male chicks decreased more rapidly and increased earlier thereafter than those of females during the first two weeks of age.

(Key words:Immunoglobulin G, broiler chicks, sex)

I. 서 론

닭의 면역글로불린에 대한 연구는 1950년대부터 두

가지의 주요 면역학적 측면에서 연구되어 왔다. 첫째는, 림프기관인 Fabricius낭이 발견되어 면역글로불린 합성의 조절 및 발달에 관한 연구로서 Fabricius낭의 면역글로불린의 조절 효과를 이해하기 위하여 면역

본 연구는 과학기술처의 특정연구개발사업 연구비(1991) 지원으로 수행되었음.

*가축위생연구소(Veterinary Research Institute, RDA)

글로불린 종류의 특성을 구명하는 일이었다고, 둘째는, 면역반응에 관한 계통발생적 발달에 관한 연구로써 이 분야의 연구는 활발히 진행 중이다.

가금류에서의 공인된 면역글로불린의 종류는 Immunoglobulin G(IgG), Immunoglobulin A(IgA)와 Immunoglobulin M(IgM)의 3가지로 명명되고 있으며, 이들은 포유동물의 IgG, IgA 및 IgM과 생물학적 특성이 유사하다(Higgins, 1975).

가금의 IgG는 포유동물의 IgG(M.W. 150,000; 7S, Roitt, 1977)보다 분자량(165,000~206,000; 7.1S)과 탄수화물함량(2.2%)이 많고 등전점(I.P., 5.7)은 낮으며 더욱 강한 음전하를 가지는 특성을 가지고 있다(Orlans, 1968; Tenenhouse et al., 1966; Leslie et al., 1968). 이러한 특성으로 Tenenhouse 등(1966)은 가금의 IgG가 포유동물의 IgG보다는 IgA와 유사하다고 하였으며 Leslie 등(1966)은 IgG를 IgY로 명명하기를 제의하였으나 IgY는 포유동물의 IgG와 생물학적 및 기능적으로 동일하기 때문에 IgG로 공인되어 명명되고 있다(Juergen, 1987). 한편, Gallagher 등(1970)은 IgG의 분리과정에서 NaCl의 농도에 따라 분자량이 347,000이 되는 IgG를 발견하였으며, 이 경우 침전계수도 11.4S로 높아진다고 Kobo 등(1969)이 보고하였다. 이와 같은 현상은 가금의 IgG 분자는 염의 농도에 민감하여 Dimer의 상태로 존재하기도 한다.

가금 IgG의 분리방법으로는 일반적으로 NaSO_4 로 염석하는 방법(Benedict, 1967b)과 이를 Sephadex G200으로 gel filtration한 후 용출된 peak를 다시 반복하거나(Gold 등, 1987), ion-exchange chromatography에 의해 분리하는 방법(Leslie 등, 1969) 등이 있다.

혈청 중의 IgG는 세포 외부에서 toxin과 virus를 중화시키는 생물적 기능을 가진다. 특히 complement system은 IgG의 도움을 받아 활성화된 후에 비로소 bacteria나 virus를 분해시킬 수 있는 능력을 가지게 된다(Fellenberg, 1978).

부화 후부터 4일령까지의 초생추의 혈청 중에는 IgM만 발견되며 4일령 이후부터 IgM이, 그리고 그리고 10~12일령부터 IgA가 발견되며 부화 직후 초생추의 혈청중 IgG농도는 3.1~7.3mg/ml 수준이었다가

2주령시에는 1일령 수준의 20% 수준으로 저하되고 그 이후부터 점차적으로 증가하여 약 6주령시에는 성추의 IgG 농도수준(4.96~8.1mg/ml)에 도달한다고 보고하였다(Van Meter et al., 1969; Martin et al., 1973; Leslie et al., 1973; Rose et al., 1981; Rammensee, 1984). 한편, Leslie 등(1975)은 병아리의 능동면역체계의 발달로 인한 IgG의 자체 합성은 1주령부터 시작되는 것으로 추정하고 있으며 Loesch (1972) 등은 저감마글로불린증 산란계의 종란으로부터 부화된 초생추는 부화 직후부터 IgG의 생합성이 일어난다고 보고하였다.

상기의 결과들은 대부분 산란계를 대상으로 한 단편적인 연구로서 사육 전기간을 대상으로 조사된 포괄적인 연구사례는 아직 미흡한 실정이다. 특히 육용계를 대상으로 사육 전기간동안의 혈중 IgG 농도 변화에 대하여 구체적으로 연구된 보고사례는 접할 수가 없다.

본 연구는 건강한 육용계에서 혈청중 IgG 농도의 주령별 수준 변화상에 대한 profile을 설정하여 이를 육용계의 성장율과 IgG 농도와의 상관성 및 질병 발생에 따른 IgG 수준의 변화 양상의 규명에 활용할 수 있는 parameter를 제공하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. IgG의 순수분리 및 동정

IgG는 성계의 혈청(chicken serum)으로부터 Leslie 등(1969, 1970)이 실시한 방법을 수정하여 saturated ammonium sulfate(SAS) 침전법과 DEAE-cellulose(DE-52)를 이용한 ion exchange chromatography법으로 Fig. 1의 과정을 거쳐 분리하였다.

분리된 IgG의 동정은 Sigma사(USA) 및 Nordic Immunological Laboratories사(Netherlands)로부터 구입된 anti-chicken IgG를 사용하여 Double Immunodiffusion법에 의하여 실시하였다.

2. 항혈청(Anti-IgG)의 대량 생산

닭의 IgG에 대한 항혈청 생산은 분리 동정된 chicken IgG를 항원으로 하여 Fig. 2와 같이 토끼에게 면역시켜 생산하였다.

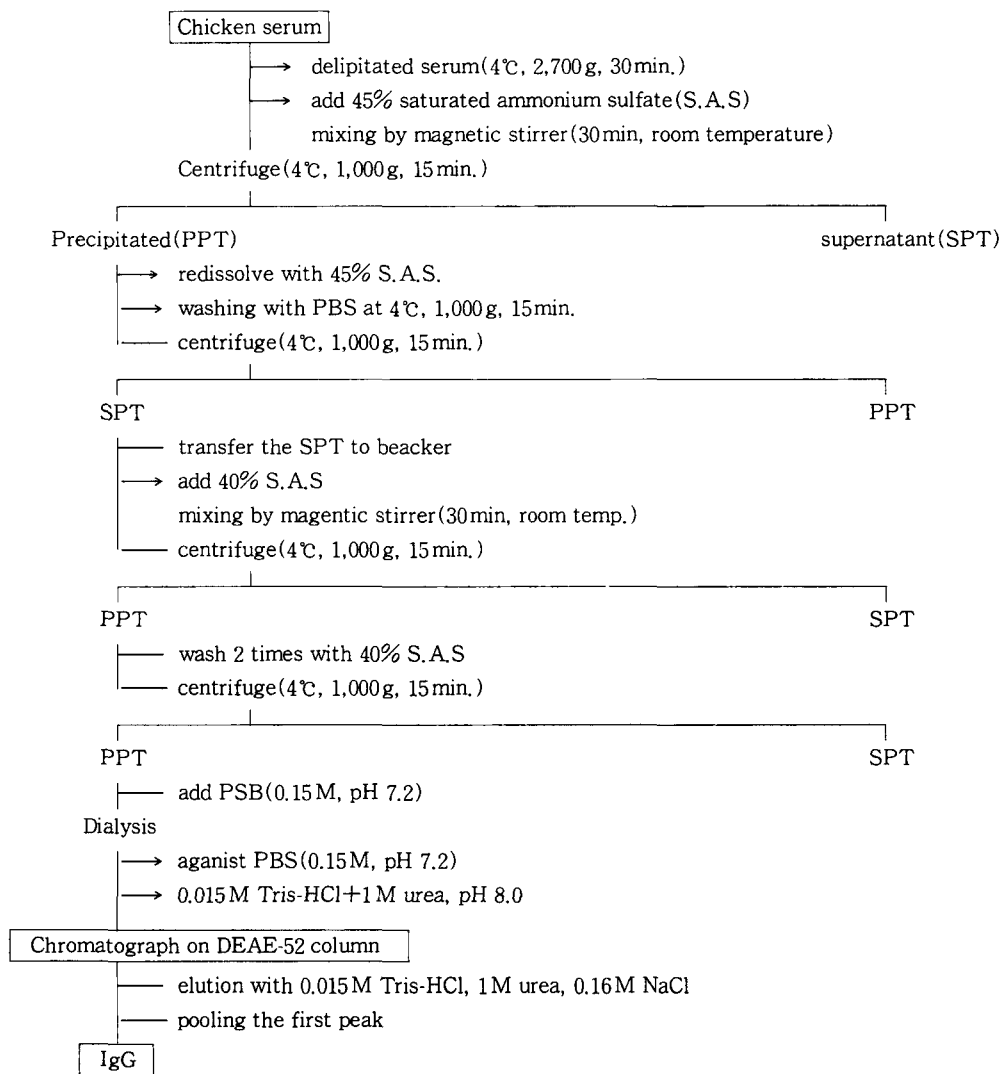


Fig. 1. Purification procedure for IgG from chicken serum

3. 혈청중 IgG의 양적 측정 방법

혈청 IgG의 농도측정은 Mancini(1965)에 의해 개발된 single radial immuno diffusion test(RID-test)를 이용하였다. 생산된 항혈청의 IgG에 대한 역가를 결정한 후 이를 1.5% agar용액에 혼합하여 antibody agar plate를 제조하였다. IgG standard는 10.0mg/ml, 5.0mg/ml, 2.5mg/ml, 1.25mg/ml, 0.63mg/ml, 0.31mg/ml로 희석하여 제조하였

고, humidity chamber에서 diffusion시켜 Antigen(IgG)과 antibody(anti-IgG)의 최적 반응시간을 결정하고 이를 이용하여 sample의 IgG농도를 측정하였다.

4. 닭의 사양 및 시료의 채취

국내에서 사육되고 있는 broiler 품종인 Hubbard 계통을 공시동물로 선정하였다. 부화후 일체의 vaccine program을 생략하였다. 급여사료는 NRC

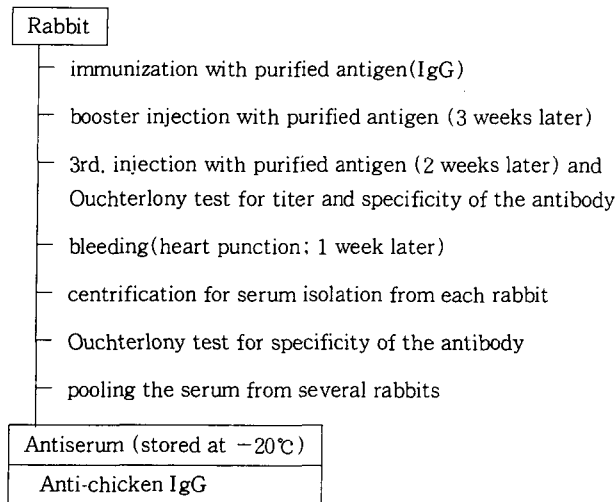


Fig. 2. Immunization procedure for anti-chicken IgG production

(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, 5일령, 1주령, 11일령, 2주령, 3주령에는 심장에서採取하였으며, 4주령, 5주령, 6주령, 7주령에서는 날개의 정맥으로부터 1ml를 채혈한 후, 3,000rpm(2,000g), 4°C에서 30분간 원심분리하여 혈청을 취한 후 -20°C에서 보관하면서 IgG 농도 측정에 이용하였다.

전 사육기간 동안 체중과 혈청 IgG 농도를 측정하였으며 통계처리는 SAS program package의 "GLM" program을 이용하였다.

III. 結果 및 考察

1. IgG의 순수분리 및 동정

IgG는 성계의 혈청(chicken serum)으로부터 Leslie등(1969, 1970)이 실시한 방법을 수정하여 saturated ammonium sulfate(SAS) 침전법과 DEAE-cellulose(DE-52)를 이용한 ion exchange chromatography법으로 Fig. 1의 과정을 거쳐 분리하였다.

DEAE-cellulose column으로부터 용출(elution)

된 분획들의 O.D.를 U.V. spectrophotometer (280 nm)로 측정된 결과 Fig. 3에 나타난 바와 같이 1개의 peak로 형성되었다. 분획된 용액중 정상 부위에 해당하는 지역의 분획들을 합쳐서 농축시킨 후 double immunodiffusion test에 의해 특이성(specificity)을 조사해 본 결과 순수한 IgG가 분리된 것으로 판명되었다(Fig. 4).

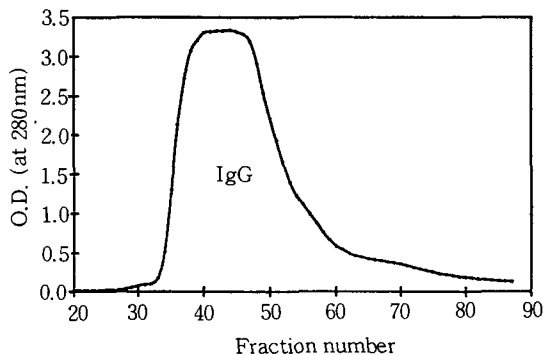


Fig. 3. Ion exchange chromatography of ammonium sulfated chicken serum on DEAE-cellulose(DE-52), 0.015 M Tris-HCl buffer, pH 8.0

2. 항혈청의 생산 및 특이성

닭의 혈청으로부터 분리된 순수 chicken IgG를 항

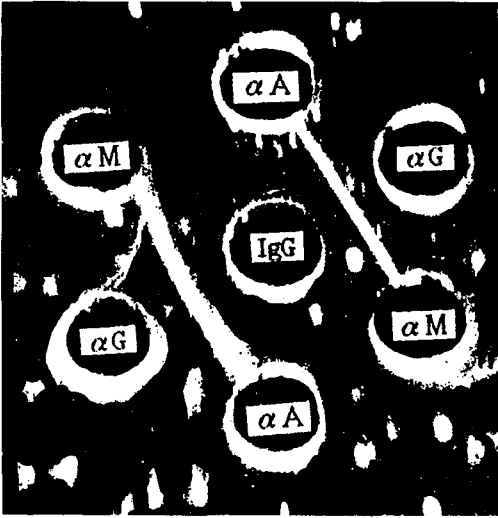


Fig. 4. Ouchterlony analysis of purified chicken IgG
 αA : anti-IgA, αG : anti-IgG,
 αM : anti-IgM

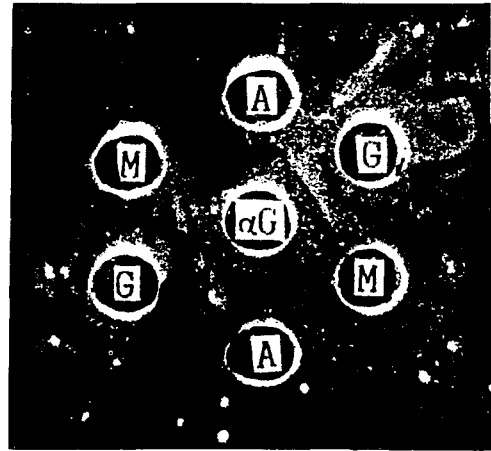


Fig. 5. Ouchterlony analysis of antiserum against chicken IgG
A : chicken IgA, G : chicken IgG
M : chicken IgM, αG : anti-IgG

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

Diffusion time(hrs.)	Regression equation of standard curve [Ln(Y)=a+bX]	R ² value
	[IgG]	
14	Ln(Y)=-3.092949178+0.678382387 X	0.998
16	Ln(Y)=-3.145695492+0.675871252 X	0.999
18	Ln(Y)=-2.854611174+0.614153405 X	0.997
20	Ln(Y)=-2.705898392+0.584224052 X	0.995
22	Ln(Y)=-2.568778822+0.554947381 X	0.993

원으로 하여 Fig. 2에 그림으로 표시한 바와 같이 토끼에 면역시켜 닭의 IgG에 대한 항혈청(anti-IgG)을 생산하였다.

생산된 항혈청에 대한 항체의 특이성을 조사한 바, Fig. 5에 제시된 바와 같이 IgG 항혈청 항원에 대하여 특이적으로 반응하여 순수한 것으로 인정되었다.

3. 혈청중 IgG의 양적 측정방법

닭의 혈청중 IgG 농도의 양적 측정방법 중 RID (radial immunodiffusion test) 측정법을 이용할 목

적으로 RID법의 측정민감도 및 재현도를 조사하였던 바 IgG의 경우 측정에 대한 민감도 및 재현도가 매우 양호하였다. 표준항원(standard antigen)에 대한 항체와의 diffusion상태를 측정하여 작성한 농도를 semi-log plot로 표준곡선(standard curve)을 diffusion 소요시간별로 작성한 바, 16시간에서 가장 양호하여 회귀직선 방정식에 대한 결정계수(R²)는 0.999로서 거의 1.00에 가깝게 나타났다(Table 1).

4. 혈청중 IgG 수준의 발육시기별 변화상

닭의 발육시기별 혈청 IgG의 수준은 Table 2와 Fig. 6에 나타난 바와 같이 부화후 1일경에는 4.25 mg/ml로 가장 높았으며 그후 급격히 감소하여 14일령에서 최소수준(0.81 mg/ml)에 도달하여 1일령의 19%수준으로 유지되다가 다시 점차적으로 증가되어 7주령에는 2.48 mg/ml로 나타났다. 본 실험의 결과

에서 부화 직후의 IgG 농도는 Rammensee(1984)의 결과와 일치하였으며 또한 생후 2주령시의 IgG 농도가 1일령 수준의 75~100%까지 감소한다고 보고한 Rose 등(1981)의 결과와 일치하는 것으로 나타났다. 그러나 7주령시의 혈청 IgG 수준은 Leslie 등(1976)이 보고한 수준(4.96~8.1 mg/ml)보다 현저히 낮게

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

(Mean \pm SD, mg/ml)

Days of Age	IgG concentration					
	n	Female	n	Male	n	Total
Day 1	20	4.31 \pm 0.203	20	4.18 \pm 0.203	40	4.25 \pm 0.142
Day 3	20	3.39 \pm 0.203	20	2.77 \pm 0.203	40	3.08 \pm 0.142
Day 5	20	1.84 \pm 0.287	20	1.72 \pm 0.287	40	1.78 \pm 0.201
Day 7	22	1.09 \pm 0.351	22	0.90 \pm 0.210	44	1.00 \pm 0.299
Day 11	20	0.97 \pm 0.287	20	0.65 \pm 0.287	40	0.81 \pm 0.201
Day 14	24	0.71 \pm 0.337	24	1.04 \pm 0.531	48	0.87 \pm 0.466
Day 21	26	0.96 \pm 0.357	24	1.01 \pm 0.457	50	0.98 \pm 0.400
Day 28	22	1.70 \pm 0.640	26	1.89 \pm 1.100	48	1.80 \pm 0.902
Day 35	26	1.79 \pm 0.646	28	1.57 \pm 0.409	54	1.68 \pm 0.538
Day 42	20	2.00 \pm 0.531	20	2.12 \pm 0.504	40	2.06 \pm 0.511
Day 49	28	2.41 \pm 0.557	24	2.55 \pm 1.022	52	2.48 \pm 0.792

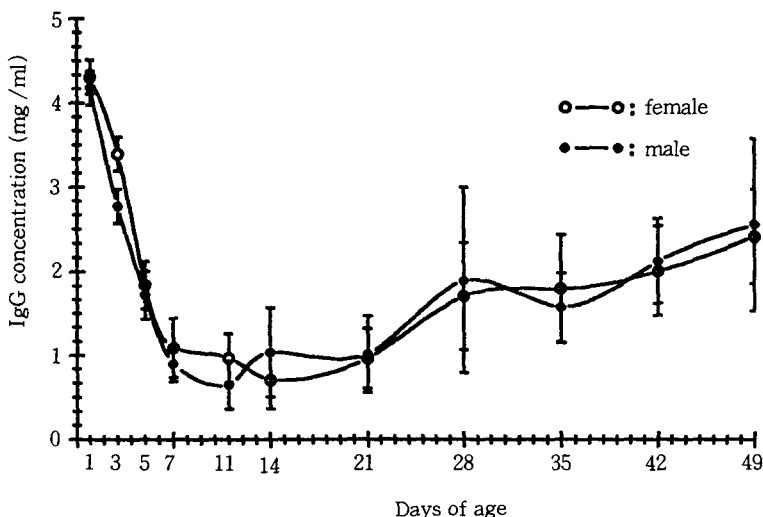


Fig. 6. Development of serum IgG levels in female and male broiler chicks during the experimental period

나타났다. 이 차이는 본 실험의 성격상 구체적인 원인 규명은 불가능하나, Leslie 등(1976)은 산란계를 대상으로 한 결과인데 비하여 본 실험에서는 vaccine 투여를 전혀 하지 않은 육용계를 대상으로 조사하였고 또한 사육 전기간중 모든 항생제 및 촉진제의 첨가를 배제한 사료를 급여함으로써 인한 유전적 및 환경적 차이로 발생한 것으로 추정된다.

이 기간중 성별에 따른 IgG의 농도는 유의차가 없는 것으로 나타났다. 1주령에서 3주령까지의 IgG의 농도는 수컷에 비하여 암컷이 약간 높은 수준을 보였으며 수컷의 IgG농도는 11일령에서 가장 낮은 수준에 도달한 반면에 암컷의 경우에는 14일령에 가장 낮은 수준에 도달하였다. 이는 수컷의 능동면역 체계가 암컷보다 조기에 발달되어 IgG의 자체생산이 11일령 이후부터 이루어지는 것으로 추정된다.

IV. 적 요

본 실험은 닭의 혈청으로부터 IgG를 순수분리하고 이에 대한 항혈청을 대량 생산하여 IgG의 양적 측정에 필요한 물질의 생산을 자체 정립하고 아울러 육용계의 전사육기간 동안의 혈청중 IgG 농도의 변화상을 조사하여 닭의 면역반응에 대한 기초적인 자료를 제공하고자 실시하였다.

1. 닭의 혈청으로부터 순수한 IgG를 분리하였으며 이를 항원으로 면역시켜 IgG에서만 특이적으로 반응하는 항혈청을 생산하였다.
2. 표준항원(IgG)에 대한 항체(anti-IgG)와의 diffusion상태를 측정하여 표준곡선을 작성한 바, diffusion소요시간이 16시간에서 가장 양호한 회귀직선방정식을 얻었다($R^2=0.999$).
3. 혈청중 IgG의 농도의 변화상은 1일령에서(4.25 mg/ml) 가장 높았으며 그 이후 급격히 감소하여 11일령에 최저수준(0.81 mg/ml; 1일령의 19%수준)에 도달하였다. 그 이후에는 서서히 증가하여 7주령시에는 2.48 mg/ml의 수준을 보였다.
4. 성별에 따른 IgG 농도간에는 유의적인 차이는 없었으며 3주령까지의 IgG의 농도는 수컷에 비하여 암컷이 약간 높은 수준을 보였다. 한편 수컷은 11일령에서 최저 수준에 도달한 반면에 암컷은 14일령에

가장 낮은 수준에 도달하여 수컷의 능동면역 체계가 암컷보다 조기에 발달되는 것으로 추정된다.

V. 引用文獻

1. Benedict, A.A. 1967b. Production and purification of chicken immunoglobulins. In "Methods in immunology and immunochemistry. Volume I", edited by C.A. Williams and M.W. Chase. pp.229-237 Academic Press, New York and London.
2. Fellenberg, R. von. 1978. Kompendium der allgemeinen Immunologie. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.
3. Gallagher, J.S. and E.W. Voss, Jr. 1970. Immune precipitation of purified chicken antibody at low pH. Immunochemistry. 7:771~785.
4. Gold, E.F. and A.A. Benedict. 1967. Comparison of polypeptide chains of gamma G-globulin from bursectomized and normal chickens. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 125:535-538.
5. Higgins, D.A. 1975. Physical and chemical properties of fowl immunoglobulins. The Vet. Bull. 45:139-154.
6. Juergens, L. 1987. Reinigung von IgG und IgG-Antikörpern aus dem Eidotter und Bestimmung der Temperaturresistenz und Saeuretenazitaet dieser Immunoproteine. Diss. Universitaet Muenchen.
7. Kobo, R.T. and A.A. Benedict. 1969. Comparison of various avian and mammalian IgG immunoglobulins for salt-induced aggregation. J. Immun. 103:1022-1028.
8. Leslie, G.A. and A.A. Benedict. 1968. Nonhemagglutinating non-dissociable 7s subunits of chicken IgM antibody. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 128:1012-1016.
9. Leslie, G.A. and L.W. Clem. 1969. Phy-

- logeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. *J. exp. Med.* 103:1337-1352.
10. Leslie, G.A. and L.N. Martin. 1973. Modulation of immunoglobulin ontogeny in chicken: effect of purified antibodies specific for μ chain on IgM, IgY and IgA production. *J. Immunol.* 110:959-967.
 11. Leslie, G.A. 1975. Ontogeny of the chicken humoral immune mechanism. *Am. J. Vet. Res.* 36:482-485.
 12. Loesch, Y. 1972. Zur Charakterisierung einer erblichen Dysgammaglobulinaemie. *Habil. Schrift, Universitaet Muenchen.*
 13. Martin, L.N. and G.A. Leslie. 1973. Ontogeny of IgA in normal and neonatally bursectomized chickens with corroborative data on IgY and IgM. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 143:241-243.
 14. Orlans, E. 1968. Fowl antibody. x. The purification and properties of an antibody to the 2,4-dinitrophenyl group. *Immunology* 14: 61-67. +2plates
 15. Rammensee, M. 1984. Immunoglobulinkonzentrationen in Serum, Sekreten, Ei und Embryo des Haushuhns. *Diss. Med. Vet., München.*
 16. Roitt, I. 1977. *Immunologie.* Dr. Dietrich steinkopff Verlag, Darmstadt.
 17. Rose, M.E. and E. Orlans. 1981. Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick. *Dev. Comp. Immunol.* 5:15-20.
 18. Tenenhouse, H.S. and H.F. Deutsch. Some physical-chemical properties of chicken gamma-globulin and their pepsin and papain digestion products. *Immunochemistry.* 3:11-20.
 19. Van Meter, R., R.A. Good and M.D. Cooper. 1969. Ontogeny of circulating immunoglobulins in normal, bursectomized and irradiated chickens. *J. Immunol.* 102:370-374.