

계란 항체의 생산에 있어서 polymerization의 효과

이 경 애

순천향대학교 자연과학대학 식품영양학과

Effect of polymerization in inducing yolk antibodies

Lee, Kyeong Ae

Dept. of food and nutrition, College of natural science, Soonchunhyang univ.

ABSTRACT

Insulin polymer was used as an immunogen to elicit homogeneous anti-insulin yolk antibodies in a large scale. Insulin polymer prepared was heterogeneous mixture (MW=6,000-70,000). Insulin polymer showed stronger immunogenicity than insulin monomer. The affinity of yolk antibodies elicited with insulin polymer was slightly lower than that of yolk antibodies elicited with insulin monomer. The specificity of yolk antibodies obtained with insulin monomer and insulin polymer was directed mostly to native insulin.

I. 서 론

Chicken의 혈액 중에는 IgG, IgM 및 IgA 등 세종류의 면역글로블린이 존재한다. 이 중 IgG만이 배란전에 receptor를 통해 선택적으로 이행되어 난황에 효율적으로 축적된다⁽¹⁻⁴⁾. 난황에는 약 1%의 IgG가 존재하여 1개의 계란에서 약 100 - 150 mg의 crude IgG가 분리되므로 항체의 대량생산이 가능하다⁽⁵⁾. 또한 난황은 식품이므로 혈청에 비해 매우 위생적이고 우수한 항체의 공급원이기도 하다.

Chicken의 면역기구는 포유동물의 면역기구와 동일한 것으로 알려져 있으나 chicken IgG는 분자량, 등전점, 포유류의 complement활성화 능력, 면역글로블린의 다양화 기구 등 포유류 IgG와 다른 특성을 갖는다⁽⁶⁻⁸⁾. 그러므로 Leslie등⁽⁶⁾은 난황 중의 항체란 의미로 chicken IgG를 IgY (yolk immunoglobulin)로 명명하고 있다.

Insulin은 임상적으로 매우 중요한 호르몬 중의 하나이다. 항원 항체 반응에 의해 혈액 중의 인슐린 측정 및 치료약으로 조제된 insulin의 분리, 정제가 가능하므로, 항원 항체 반응의 효율을 높이기 위해 높은 특이성과 친화성을 갖는 anti-insulin antibody의 대량생

산이 요구되어왔다. 현재 anti-insulin antibody는 guinea pig의 항혈청에서 분리, 정제하여 임상검사 등에 응용⁽⁹⁻¹⁰⁾되고 있다. 그러나 guinea pig는 insulin shock을 일으키기 쉽고, 항체생산에 많은 비용이 들며, 항혈청을 이용한 특이항체의 대량생산은 어려운 실정이다. 한편 chicken은 insulin shock을 일으키지 않고, 난황에서 손쉽게 특이항체의 대량생산이 가능하므로 계란항체를 이용하면 상기의 문제점 해결이 가능하다고 생각된다.

일반적으로 저분자량 항원, 즉 hapten에 대한 면역응답성은 고분자량 항원에 대한 면역응답성보다 낮다. 그러므로 hapten에 대한 특이항체의 유도나 항체 생산량의 증가를 위해서는 keyhole limpet hemocyanin과 같은 고분자 단백질 (carrier protein)을 hapten에 결합시켜 면역하는 방법을 사용한다. 이 carrier effect는 포유류 뿐아니라 조류에서도 나타나는 것으로 보고되어 있다⁽¹¹⁻¹²⁾. 그러나 이 방법은 hapten에 대한 항체보다 항원성이 큰 carrier protein에 대한 항체가 다량 유도되는 문제점이 있다.

따라서 본 연구는 저분자량의 호르몬인 insulin (MW=5,750)에 대한 chicken의 면역응답성을 높이는 동시에 균일한 항체집단이 유도될수 있도록 하기위해 비

교적 고분자량의 insulin polymer를 면역원으로 이용하여, 면역응답성 및 유도된 IgY의 특성을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

Insulin monomer (insulin (M)) 및 insulin polymer (insulin (P))의 면역에 의해 얻어진 면역계란에서 분리한 계란항체 및 항혈청을 실험재료로 사용하였다.

2. Chicken의 면역

Rhode island red계의 chicken (28-week-old, female)을 이용하여 insulin (M) (actrapid human insulin, Novo Co.) 및 insulin (P)를 각각 adjuvant와 함께 2주 간격으로 4회 면역하였다. 초기면역은 각 항원 (1mg/0.5ml of phosphate buffered saline; PBS)과 complete Freund's adjuvant (Difco) 0.5ml와 혼합하여 근육주사하였다. 초기면역후, 3회에 걸친 추가 면역은 incomplete Freund adjuvant (Difco)와 함께 각 항원을 면역하였다.

3. Insulin polymer의 조제

Insulin (P)는 Tang 등⁽¹³⁾의 방법에 따라 glutaraldehyde를 사용하여 조제하였다. 0.5% insulin용액 (in PBS) 5ml와 동량의 0.2% insulin 용액 (in PBS)을 혼합한 후 0.25% glutaraldehyde 10ml를 천천히 첨가하였다. 이 혼합용액이 들어 있는 비이커의 표면을 알루미늄 호일로 싸서 빛을 차단하고 실온에서 6시간 방치하였다. 4°C에서 50mM glycine를 함유한 PBS 및 PBS에 대하여 투석한 후, 동결건조하여 시료로 사용하였다.

Insulin (P)의 분자량은 Tricine SDS-PAGE에 의해 검토하였다.

4. Insulin의 reduced-carboxymethylation (RCM화)

Insulin의 disulfide 결합은 2-mercaptoethanol을 사용하여 환원시키고, 이때 생성된 SH기는 McKenzie 등⁽¹⁴⁾의 방법에 따라 carboxymethylation하였다. Insulin 10mg을 0.2M Tris-EDTA buffer (pH 8.5) 1.9ml에 용해시킨 후, 10M 요소용액 (in 0.2M Tris-EDTA buffer, pH 8.5) 8ml 및 2-mercaptoethanol 100 μ l를 첨가하여

잘 혼합하였다. 이 용액은 질소치환 후 37°C에서 4시간 방치하였다. 0.2M Tris-EDTA 2ml에 iodoacetic acid 303.5mg을 용해시켜 혼합한 후 37°C에서 40분간 반응시키고, 0.5M sodium acetate buffer (pH 5.0) 5ml를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 4°C에서 0.01M acetic acid 및 deionized water로 투석한 후 동결건조하여 시료로 사용하였다.

Insulin의 RCM화는 고속액체크로마토그래피 (HPLC) 및 아미노산 분석법에 의해 확인하였다.

5. 계란항체의 분리

난황 중의 항체는 γ -carregeenan을 사용하여 Hatta 등⁽¹⁵⁾의 방법에 따라 분리하여 항체가의 측정에 이용하였다. 난황 1g과 0.1% γ -carregeenan용액 9ml를 혼합하여 실온에서 30분간 방치하였다. 혼합액을 원심분리 (1000xg, 10분)하여 계란항체를 함유한 수용성 단백질 부분 (WSP)인 상등액을 분리하였다.

6. RCM-insulin의 HPLC

Insulin의 RCM화는 HPLC (Tri Rotar SR-2, 일본분광)를 이용하여 확인하였다. RCM-insulin 1mg을 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) 1ml에 용해시켜 HPLC를 행하였다. Column은 ODS column인 Hibar Lichrosorb RP-18 column (04.6x250mm, 관동과학)을 이용하였다. 이동상으로는 0.1% TFA (A)와 95% acetonitrile (B)을 사용하였다. A, B를 각각 100%, 0%에서 시작하여 B를 1분간 1%씩 증가시키며 분석하였다. 용출유속은 1ml/min, column의 온도는 40°C, 검출파장은 230nm이었다.

7. 아미노산 분석

HPLC에 의해 분리된 insulin의 RCM-A chain 및 RCM-B chain의 아미노산 조성을 amino acid analyzer 835 (Hitach)에 의해 확인하였다. 시료 10 μ g이 들어 있는 시험관에 6N HCl 500 μ l 및 phenol 10 μ l를 넣어 혼합한 후, 탈기와 질소치환을 3회 반복하였다. 다시 탈기한 후, 130°C에서 3시간 가열분해 후 건조시켜, 1/50N HCl 60 μ l에 용해시켜 아미노산 분석을 실시하였다.

8. 비경쟁 효소 면역 측정법 (noncompetitive ELISA)⁽¹⁶⁻¹⁷⁾

항혈청과 WSP의 항체가는 noncompetitive ELISA에

의해 측정하였고 모든 반응은 실온에서 행하였다. Microtiter plate (Nunc, Maxisorp)에 0.01% insulin 용액 (in 50mM carbonate buffer)을 100 μ l/well 첨가하여 2시간 동안 coating하였다. 0.02% Tween을 함유한 PBS (PBS-Tween)용액으로 well을 씻은 후 PBS-Tween으로 적당히 희석한 항체용액을 100 μ l/well 첨가하여 2시간 동안 반응시켰다. PBS-Tween으로 well을 씻은 후 alkaline phosphatase rabbit anti-chicken IgG (H+L) conjugate (Zymed)를 100 μ l/well 첨가하여 2시간 동안 반응시켰다. 다시 PBS-Tween으로 well을 씻은 후 0.1% sodium p-nitrophenyl phosphate (in diethanolamine HCl buffer, pH 9.8)를 100 μ l/well 첨가하여 30분간 발색시켰다. 5N NaOH를 20 μ l/well 첨가하여 발색반응을 정지시키고 ELISA reader (Corona)를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

9. 경쟁 효소 면역 측정법 (competitive ELISA)^(16, 18)

두 종류의 항원에 의해 유도된 계란항체의 insulin (M) 및 insulin (P)와의 반응성을 competitive ELISA에 의해 해석하였으며, 모든 반응은 실온에서 행하였다. 0.01% insulin용액을 100 μ l/well 첨가하여 2시간 동안 coating하였다. 일정농도의 항체용액과 여러 농도의 competing 항원용액을 조제하여, 항체, competing 항원의 순으로 각각 50 μ l/well씩 첨가한후 25°C에서 2시간 competing시켰다. 이 이후의 반응은 noncompetitive ELISA와 같이 conjugate, 기질을 반응시켜 저해도를 측정했다. 저해도는 positive control의 ELISA value (Bo)에 대한 competing 항원이 존재할 때의 ELISA value (B)의 비로 나타내었다.

또한 두 종류의 항원에 의해 유도된 항체와 다른 동물의 insulin과의 반응성을 competitive ELISA에 의해 검토하였다. 모든 반응은 위와 동일한 방법을 사용하였다. 단, competing 항원으로 human insulin (Novo Co.), pork insulin (Sigma), horse insulin (Sigma), sheep insulin (Sigma), human proinsulin (Sigma)을 사용하였다.

10. Tricine SDS-PAGE

Tricine SDS-PAGE는 Schagger등⁽¹⁹⁾의 방법에 따라 행하였다.

3의 방법에 따라 조제한 insulin (P)는 sample buffer

(containing 4% SDS, 12% glycerol, 50mM Tris, 2% mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue, pH 8.6)에 0.2% 농도로 용해시킨 후, 40°C에서 30분간 incubation하여 gel에 apply하였다.

전기영동용 gel은 하단에서부터 separating gel (15cm), spacer gel (3cm), stacking gel (2cm) 등 세 부분으로 이루어져 있다. Separating gel은 acrylamide 및 bisacrylamide를 각각48% (w/v), 1.5% (w/v)의 농도로 용해시킨 acryl-bis용액 10ml, gel buffer 10ml 및 glycerol 4g을 혼합한 후, 30ml가 되도록 증류수를 첨가하였다. Spacer gel은 acryl-bis용액 6.1ml와 gel buffer 10ml를 혼합한 후, 30ml가되도록 증류수를 첨가하였다. Stacking gel은 acryl-bis용액 1ml와 gel buffer 3.1ml를 혼합한 후, 12.5ml가 되도록 증류수를 첨가하였다. gel은 각각 10% ammonium persulfate 100 μ l와 TEMED 10 μ l를 혼합하여, separating gel, spacer gel, stacking gel의 순으로 polymerize하였다.

Gel buffer로는 Tris 및 SDS를 각각 3M, 0.3%의 농도로 용해시킨 용액 (pH 8.45)을 사용하였다. Anode buffer로는 0.2M Tris 용액 (pH 8.9)을, cathode buffer로는 Tris, Tricine, SDS를 각각 0.1M, 0.1M, 0.1%의 농도로 용해시킨 용액 (pH 8.25)을 사용하였다.

전기영동 후 고정액 (50% (v/v) methanol-10% acetic acid (v/v))으로 1시간 동안 고정하고, 0.01% Coomassie brilliant blue R-250으로 2시간 동안 염색한 후, 10% (v/v) acetic acid용액으로 탈색하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Insulin polymer의 분자량

조제한 insulin (P)의 분자량을 Tricine SDS-PAGE에 의해 검토했다 (Fig. 1). Insulin (P)는 insulin monomer, insulin dimer를 포함하는 분자량 6,000-70,000사이의 여러가지 분자량을 갖는 물질들의 혼합물이었다.

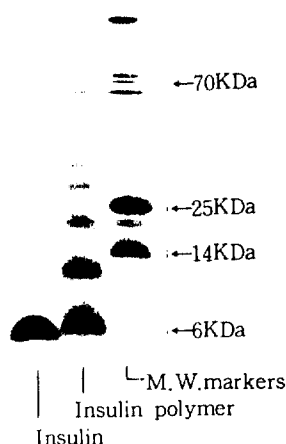


Fig. 1. Tricine SDS-PAGE electrophoretic Patterns of insulin polymer.

Bovine whey proteins were used as molecular weight(M.W) maker

2. Insulin의 RCM화

Insulin의 RCM화는 HPLC 및 아미노산 분석에 의해 확인하였다. RCM-insulin을 HPLC에 의해 분석한 결과 Fig. 2에 나타낸바와 같이 두개의 peak가 나타났다. HPLC에 의해 분리된 각 peak의 아미노산 조성을 아미노산 분석기에 의해 검토한 결과(Table 1), peak A 및 peak B는 각각 insulin의 A chain, B chain임이 확인되었다. Insulin은 RCM화에 의해 3개의 disulfide결합이 환원되어 carboxymethylation되므로⁽²⁰⁾ RCM-A chain 및 RCM-B chain으로 분리된다. 따라서 반응에 사용한 insulin은 모두 RCM화한 것으로 생각된다.

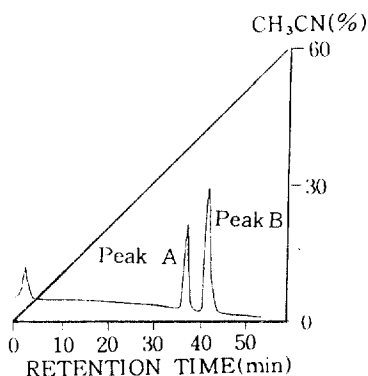


Fig. 2. HPLC pattern of RCM-insulin.

Table. 1. Amino acid composition of RCM-A chain and RCM-B chain of insulin purified by HPLC

Amino acids	RCM-A chain (μ mole)	RCM-B chain (μ mole)
Asp	2.5 (2.0)	1.1 (1.0)
Thr	1.3 (1.0)	2.0 (2.0)
Ser	2.3 (2.0)	0.9 (1.0)
Glu	4.5 (4.0)	2.8 (3.0)
Gly	1.4 (1.0)	2.9 (3.0)
Ala	0.0 (-)	0.8 (1.0)
Cys	0.3 (4.0)	0.5 (2.0)
Val	0.5 (1.0)	1.6 (3.0)
Ile	1.2 (2.0)	0.0 (-)
Leu	2.5 (2.0)	2.8 (4.0)
Tyr	2.2 (2.0)	1.5 (2.0)
Phe	0.0 (-)	2.4 (3.0)
Lys	0.0 (-)	1.1 (1.0)
His	0.0 (-)	1.6 (2.0)
Arg	0.0 (-)	1.2 (1.0)
Pro	0.0 (-)	0.8 (1.0)

*(): Amino acid composition of A and B chain of native insulin

3. 항체의 변화

Insulin (M) 및 insulin (P)의 면역에 의해 유도된 anti-insulin IgY의 양을 noncompetitive ELISA에 의해 검토하여 Fig. 3에 나타내었다.

Insulin (M)을 면역한 결과, 2회 면역 후 난황에서 anti-insulin IgY가 검출되었다. 4회 면역후, 최대치에 도달했고, 그후 항체가 감소하기 시작하여 16주부터는 anti-insulin IgY가 검출되지 않았다. 한편 insulin에 대한 항체의 양을 증가시키기 위해 insulin 유도체인 insulin (P)를 조제하여 면역원으로 사용한 결과 매우 많은 양의 항체가 유도되었다. 즉 1회 면역 후, 혈청 중에서 anti-insulin IgY가 검출되었고, 이로부터 1주일 후에는 난황에서도 검출되었다. 혈청과 난황의 항체는 6주째에 최대치에 도달하였으나, 그후 감소하기 시작했다. 항체는 14주째부터 큰 감소를 보이긴 하였으나 4회면역 후 14주간 비교적 높은 항체가를 유지하였다. Insulin (M) 및 insulin(P)를 면역한 결과 난황의 항체는 난황의 항체가보다 조금 낮았으나 두 면역원에 의해 혈액 중에 유도된 anti-insulin IgY는 효율적으로 난황에 이행되었다고 생각된다. 조제한 insulin (P)에는 소량의 insulin (M)가 존재하였으므로 gel filtration에 의해 insulin (M)의 일부를 제

거한 insulin (P)를 조제하여 면역하였으나 Fig.3 (A)와 같은 결과를 나타내었다.

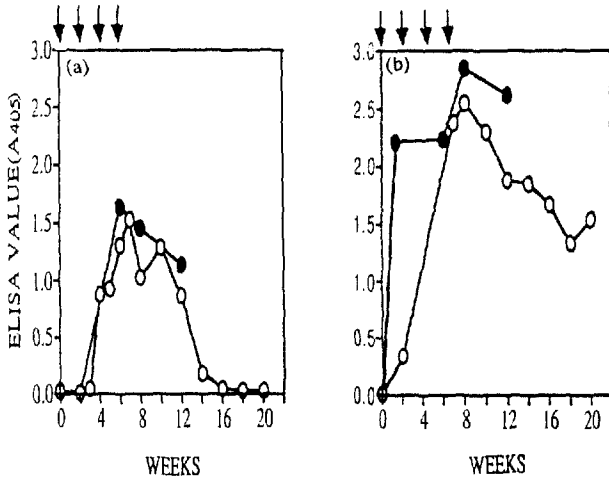


Fig. 3. Changes of antibody responses in the serum and egg yolk from chickens immunized with insulin monomer and insulin polymer.

Anti-insulin antibody titers were measured by ELISA using insulin monomer (a), or insulin polymer (b) as immunogen and expressed as ELISA value(absorbance at 405nm) for serum(●) and egg yolk (○) at 1:1000 dilution. Arrows indicate weeks of injection

이와같이 chicken이 insulin을 갖고 있음에도 불구하고 비교적 저분자량 항원인 insulin(M)에 대한 항체가 유도되었으며, insulin (P)의 면역에 의해 보다 많은 항체가 유도되었다. insulin은 중합화에 의해 B cell에서의 항체생산을 유도시키는 helper T cell에 의해 인식되기 쉬운 구조⁽¹²⁾를 갖는것으로 생각되나, 앞으로 insulin(P)의 구조는 자세히 검토되어야 할 것으로 생각된다.

4. 항체의 친화성

두 종류의 항원에 의해 유도된 항체의 친화성을 검토하였다 (Fig. 4). ELISA plate에 insulin (M)을 coating하였고, insulin (M)을 competing 항원으로 사용하여 competitive ELISA를 행하였다. Insulin (P)에 의해 유도된 계란항체의 친화성은 insulin (M)에 의해 유도된 계란항체의 친화성보다 조금 낮았으나 큰 차이

는 없었다.

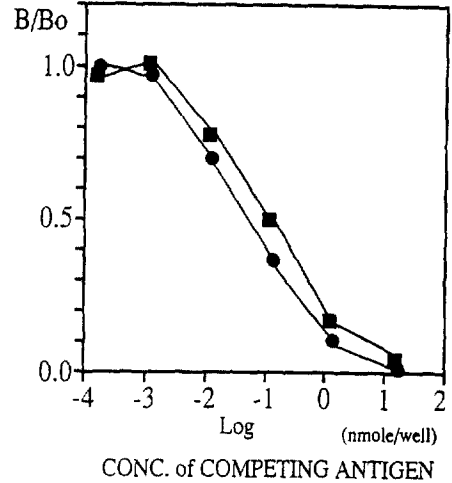


Fig. 4. Competitive binding curves of insulin monomer to antiinsulin yolk antibody elicited with insulin monomer and insulin polymer.

Competitive ELISA was performed using yolk antibodies from chickens immunized with insulin monomer(●), or insulin polymer(■).

B/Bo =(absorbance at the last step of ELISA in presence of various concentration of a competing antigen)/(absorbance in the absence of a competing antigen)

5. 항원 특이성

Insulin (P)에 의해 유도된 항체의 항원 특이성을 insulin (M)에 의해 유도된 항체의 항원 특이성과 비교 검토하였다.

두 종류의 항원에 의해 유도된 항체와 insulin (M) 및 RCM-insulin과의 반응성을 검토하였다. Plate에 insulin (M)을 coating하고 insulin (M) 및 RCM-insulin을 competing 항원으로 사용하여 competitive ELISA를 행한 결과 (Fig. 5), insulin (M) 및 insulin (P)에 의해 유도된 각 항체는 RCM-insulin을 거의 인식하지 않았고 insulin (M)만을 인식하였다. Insulin은 RCM화에 의해 3개의 disulfide 결합이 환원되고 α -helix 및 β -sheet같은 2차구조가 거의 파괴되므로⁽²⁰⁾ disulfide 결합에 의해 유지되는 conformational한 항원 결정기를 인식하는 것으로 생각된다.

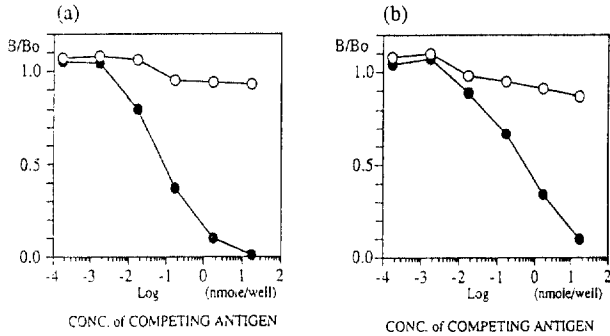


Fig. 5. Competitive binding curves of insulin monomer and RCM-insulin to anti-insulin yolk antibodies

Competitive ELISA was performed using yolk antibodies from chickens immunized with insulin monomer (a), or insulin polymer (b). The competing antigen was insulin monomer (●), or RCM-insulin (○)

한편 다른 동물의 insulin과의 반응성을 competitive ELISA에 의해 검토하였다 (Fig. 6). Table 2에 나타낸바와 같이 competing 항원은 human insulin과 A chain loop (A8-A10) 및 B30의 1차구조가 다르다. Insulin (M)에 의해 유도된 계란항체는 실험에 사용되었던 사람, 돼지, 소, 말, 양 등 동물의 종류와는 관계없이 같은 정도의 반응성을 나타내었고, human proinsulin과는 조금 약한 반응성을 나타내었다. Insulin (P)에 의해 유도된 계란항체는 본 실험에 사용한 모든 competing 항원과 같은 정도의 반응성을 나타내었다. 따라서 두 종류의 항원에 의해 유도된 대부분의 계란항체는 A chain loop 및 B30에서의 1차구조의 차이 및 1차구조의 변화에 따른 2차구조의 변화는 거의 인식하지 않으며, B chain에 존재하는 항원 결정기를 인식하는 것으로 생각된다. Schreor등⁽²¹⁾에 의하면 mouse는 A chain loop와 A chain loop부근을 인식하는 항체를 많이 유도하였다. 한편 Barcinski등⁽²²⁾은 guinea pig에서 유도되는 항체의 항원 결정기는 A chain loop에 집중되어 있다고 보고하고 있다. 이와같이 포유류와 다른 항원 결정기를 갖는 계란항체는 B chain의 분리 및 변성도 측정에 이용가능한 것으로 생각된다.

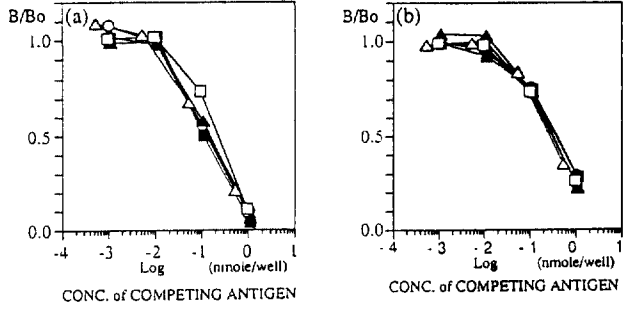


Fig. 6. Competitive binding curves of variants of insulin to anti-insulin yolk antibodies elicited with insulin monomer and insulin polymer.

Competitive ELISA was performed using anti-insulin yolk antibodies from chickens immunized with insulin monomer (a), or insulin polymer (b). The coating antigen was human insulin (●), pig insulin (○), cow insulin (▲), horse insulin (■), sheep insulin (△), or human proinsulin (□).

Table.2. Amino acid sequences of species variants of insulin.

Insulin species	A Chain		
	1	8 10	21
Human	GIVEQCCTSI	C	SLYQLQNYCN
Pig	GIVEQCCTSI	C	SLYQLQNYCN
Cow	GIVEQCCASV	C	SLYQLQNYCN
Horse	GIVEQCCTGIC	S	LYQLQNYCN
Sheep	GIVEQCCAGV	C	SLYQLQNYCN
Chicken	GIVEQCCHNT	C	SLYQLQNYCN

Insulin species	B Chain		
	1		30
Human	FVNHL	CGSHLVQALYL	VCGRGFFYTPLT
Pig	FVNHL	CGSHLVQALYL	VCGRGFFYTPLA
Cow	FVNHL	CGSHLVQALYL	VCGRGFFYTPLA
Horse	FVNHL	CGSHLVQALYL	VCGRGFFYTPLA
Sheep	FVNHL	CGSHLVQALYL	VCGRGFFYTPLA
Chicken	AANHL	CGSHLVQALYL	VCGRGFFYTPLA

6. Insulin (M) 및 insulin (P)와의 반응성

Insulin (P)에 의해 insulin (P)만을 인식하는 항체가 유도될 것으로 생각되어 insulin (M) 및 insulin (P)와의 반응성을 검토하였다. ELISA plate에 insulin (M)을 coating하고, insulin (M) 및 insulin (P)를 competing 항원으로 이용하여 competitive ELISA를 행한 결과 (Fig. 7), 두 종류의 항원에 의해 유도된 항체는 면역원에 관계없이 insulin (M)보다 insulin (P)에 매우 강한 반응성을 나타내었다. Insulin (M)에 의해 유도된 항체도 insulin (P)와 강한 반응성을 나타내었으므로 insulin (P)만을 인식하는 항체는 거의 유도되지 않았다고 생각된다.

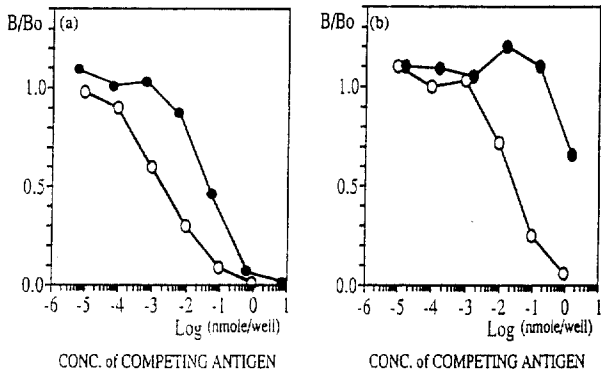


Fig. 7. Competitive binding curves of insulin monomer and insulin polymer to anti-insulin yolk antibodies elicited with insulin monomer and insulin polymer.

Competitive ELISA was performed using anti-insulin yolk antibodies elicited with insulin monomer (a), or insulin polymer (b). The coating antigen was insulin polymer (○), or insulin monomer (●).

요 약

Insulin (P)를 면역원으로 이용하여 insulin에 대한 균일한 항체집단의 대량유도 가능성 및 유도된 항체의 특성을 검토하였다. Insulin (P)의 면역에 의해 많은양의 anti-insulin IgY가 유도되었다. Insulin (P)

에 의해 유도된 IgY는 insulin (M)에 의해 유도된 IgY보다 조금 낮은 친화성을 나타내었으나 큰 차이는 없었다. 두 종류의 면역원에 의해 유도된 IgY는 대부분 insulin (M)을 인식하였으며, 같은 항원 특이성을 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Patterson, R., Younger, J.S., Weigle, W.O., and Dixon, F.J. (1962), *J. Gen. Pathol.*, 45:501.
2. Patterson, R., Younger, J.S., Weigle, W.O., and Dixon, F.J. (1962), *J. Immunol.*, 89:272.
3. Rose, M.E., and Orlands, E. (1981), *Dev. Com. Immunol.*, 5:15.
4. Joseph, B., and Malkinson, M. (1980), *J. Viro I. Methods*, 1:179.
5. Losch, U., Schraner, I., Wanke, R., and Jurgen, L. (1986), *J. Vet. Med. B.*, 33:609.
6. Leslie, G.A., and Clem, E.W. (1969), *J. Exp. Med.*, 130:1337.
7. Higgins, D.A. (1975), *Vet. Bull.*, 45:139.
8. Benedict, A.A. (1979), *Immunoglobulin characteristics: chicken, in inbred and genetically defined strains of laboratory animals, part 2, biological handbooks III*, p.658.
9. Kato, K., Umeda, Y., Suzuki, F., Hayashi, D., and Kosaka, A. (1979), *Clin. Chem.*, 25:1306.
10. Kato, K. (1986), *Insulin, in Methods of enzymatic analysis, 3rd ed., vol.9, Protein and peptide*, p348
11. Mitchison, N.A. (1971), *Eur. J. Immunol.*, 1:1.
12. Roitt, I.M., Bronstoff, J., and Male, D. K. (1985), *Immuology*, p.8.2.
13. Tang, X.L., Treger, G.W., White, D.O., and Jackson, D.C. (1988), *J. Viro I.*, 61:474'5.
14. McKenzie, X.L., Ralston, G.B., and Shaw, D.C. (1972), *Biochem.*, 11:4359.
15. Hatta, H., Kim, M.J., and Yamamoto, T. (1990), *Agri. Biol. Chem.*, 54:2531
16. 宮井 深, 石川榮治, 河合 忠 (1978), *酵素免疫測定法*, 醫學書院, P.30.
17. 田板挺雄, 浜島義博 (1981), *免疫實驗操作法X*, P.3165.

18. Envall, E., and Perlmann, P. (1972), *J. Immunol.*, 109:129.
19. Schagger, H., and Jagow, G.V. (1987), 166:368.
20. Wu, C.S.C., and Yang, J.T. (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, 667:285.
21. Schroer, J.A., Bender, T., Feldmann, R.J., and Kim, K.J. (1983), *Eur. J. Immunol.*, 13:693.
22. Barcinski, M.A., and Rosenthal, A.S. (1977), *J. Exp. Med.*, 145:726.