

24-4

牛、豬、雞免疫球蛋白之純化

林榮培 費昌勇 黃天祥 呂榮修 馬屏禾*

台灣省家畜衛生試驗所

利用 50% 飽和度之硫酸銨鹽析、陰離子交換樹脂層析、不容性色層分析及線性濃度遞增之陰離子交換樹脂層析，製得了純化之豬免疫球蛋白 IgG。

經 40% 飽和度之硫酸銨鹽析、線性鹽類濃度遞增之陰離子交換樹脂層析，再以 Fractogel^(R) TSK HW 55 進行不容性層析，製得牛免疫球蛋白 IgG₂。

雞之血清經 30% 飽和硫酸銨鹽析、DEAE cellulose 層析、再經 Sephacryls-300 色層分析，可得純化 IgG。

家畜禽之免疫診斷法是獸醫傳染病防疫上重要診斷方法（例如 ELISA、RIA 等）^(2, 7)。其中所須要用到之基本重要材料為免疫球蛋白之抗血清，這些診斷方法中對抗血清之需要量甚大，外購十分昂貴，且有部份之家禽如鴨、鵝等免疫球蛋白抗體根本沒有商品，因此擬自行研製生產並力求提昇其品質，對國外尚未發展之家禽之免疫球蛋白，則自行研究純化方法。本研究利用鹽析、離子交換樹脂及不容性色層分析等技術^(1, 4, 5)，純化家畜禽免疫球蛋白，供為將來製造抗血清之用。

材料與方法

豬、牛、雞之血清於本所自行取材。

豬免疫球蛋白 IgG 之純化：

豬血清 100 ml 經 50% 飽和度之硫酸銨沉澱後以 0.01 M，pH 7.6 之磷酸溶液透析，並以此相同溶液進行陰離子交換樹脂（DEAE cellulose）層析。所析出之蛋白質再進行不容性色層分析（Gel filtration）。取得主尖峰蛋白質後，再進行線性濃度遞增之陰

離子交換樹脂層析：以 0.01 M Tris，pH 8.0 為基本溶液（initial buffer），以含 1 M NaCl 之基本溶液為終點溶液（limit buffer）。層析所得之第一個尖峰即為純 IgG。以上之方法係參考輝武⁽⁴⁾等人之方法並加以修改而成。

牛 IgG₂ 之純化：

牛 IgG₂ 之純化係依據 Porter 與 Noakes⁽⁸⁾ 之方法修改而成。牛血清加飽和硫酸銨至 40% 後取球蛋白沈澱。此球蛋白再經線性鹽類濃度遞增之陰離子交換樹脂（DEAE cellulose）層析：以 0.01 M Phosphate buffer，pH 7.6 為基本溶液（initial buffer），以含 1 M 氯化鈉之基本溶液為終點溶液（limit buffer）層析所得之第一個尖峰經濃縮後再以 Fractogel^(R) TSK HW 55 ** 進行不容性層析。所得之主尖峰即為牛之 IgG₂。其鑑定係以標準之抗牛全血清及抗牛 IgG₁，IgG₂ 血清分別做免疫電泳法（Immuno-electrophoresis）及凝膠沈降法（Agar gel precipitation）為之。

* 國立台北護理專科學校

雞 IgG 之純化^(1,11)：

雞血清經 PBS 兩倍稀釋，將稀釋之血清加飽和硫酸銨溶液至 30 % 之飽和度後以 3,000 rpm 離心 15 分鐘。沉澱以 PBS 溶解後以 1M Urea, 0.01 M Tris, pH 8.0 之溶液置 4 °C 透析。經透析之蛋白質加入事先經 1 M Urea, 0.01 M Tris, pH 8.0 之溶液平衡好之 DEAE Cellulose (4.5 × 50 cm) 層析柱，以 0.06 M NaCl, 1 M Urea, 0.01 M Tris, pH 8.0 之溶液層析。層析所得之蛋白質先經 PBS 透析以去除 Urea，然後加飽和硫酸銨溶液至 45 % 之飽和度以 3,000 rpm 離心 15 分鐘。所得之沉澱以 PBS 透析，然後以 Sephacryl S- 300 層析 (2.5 × 100 cm)，取尖峯 (Peak) 之主要部份，即得純化之 IgG。其種類及純度分別以兔抗雞 IgG 及標準抗血清和兔抗雞全血清之抗血清以免疫電泳法分析。

免疫電泳法：

按 Schreiner 和 Pesce⁽¹¹⁾ 之方法實施：仿凝膠免疫擴散法將溶於 Barbitol buffer 之 0.85 % Agarose 灌於載玻片上。打洞，sealed，加抗原後以 Barbitol buffer 液電泳。電壓為 100mv，電泳時間為 120 ~ 150 分鐘 (視 Bromophenol blue 之位置調整時間)。電泳後立刻挖溝，sealed，加抗體。抗體抗原於凝膠內反應之後將玻片浸於 4 °C 之 PBS 溶液中，以磁棒攪動溶液，每 8 小時換液一次，共 6 次。然後取出，於 Agarose 上蓋以濕濾紙，於室溫中陰乾，以 1 % 之 Amido Black (溶於 450 ml 之 12% 冰醋酸，450 ml 之 16% 醋酸鈉，及 100 ml 甘油之混合溶液中) 染色 30 ~ 60 分鐘。復置溶於 50 % 甲醇之 1 % 醋酸液中脫色 1 小時，以移去過多之染料。

結 果

猪 IgG 之純化：

猪血清經硫酸銨沉澱後即直接以 0.01 M, pH 7.6 之磷酸緩衝液透析。透析後以 5,000 rpm, 30 分鐘離心後取上清液，以 0.01 M, pH 7.6 之磷酸緩衝液進行陰離子交換樹

脂層析。經陰離子交換樹脂層析後之蛋白以不容性色層分析 3 次後可得一常態分佈之尖峯 (圖 1)。取尖峯中央之陰影部份以免疫電泳法分析後得知尚未純化，故再以線性濃度遞增之陰離子交換樹脂層析。經此一處理後可得一主尖峯及一次尖峯 (圖 2)。此二尖峯分別回收並以免疫電泳分析得知所純化之物質與抗猪全血清之抗血清僅出現一條沉降線 (圖 3)。再將此物質與進口之抗猪 IgG 抗血清，行凝膠沉降試驗，結果再出現明顯之沉降反應 (圖 4)。故可證實所純化之物質為純猪之 IgG 無誤。每 100 ml 之猪血清可得 730 mg 之純 IgG。

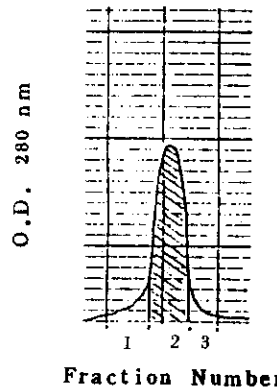


圖 1 經硫酸銨鹽析及陰離子交換樹脂處理後之猪血清蛋白，經 3 次不容性色層分析之最後圖形。陰影部份為回收之蛋白質。

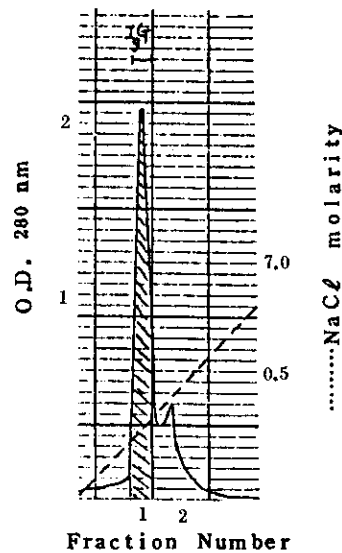


圖 2 經圖 1 不容性色層分析後回收之血清蛋白，再以線性濃度遞增之陰離子交換樹脂層析之圖形。陰影為回收之蛋白質 (IgG)。

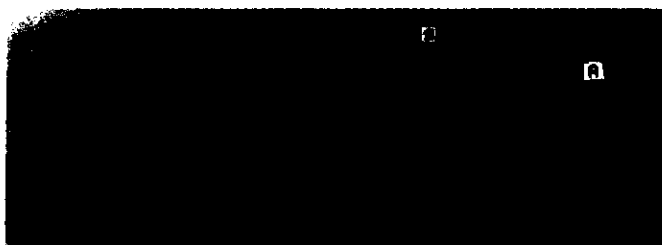


圖3 經純化後之 IgG(g)以免疫電泳分析其純度。S：豬之全血清。上、下溝(A)內均為抗豬全血清之抗血清。



圖4 以試管沉降試驗之抗體抗原結合沉澱之抗血清(1)和進口之抗豬 IgG 抗血清(2)，與豬之全血清(s)和筆者純化之 IgG(g)經凝膠沉降試驗之反應結果。

牛 IgG₂ 之純化及其鑑定：

硫酸銨塩析之球蛋白經陰離子交換樹脂層析後共得 4 個尖峯 (圖 5)。取第一個尖峯，經濃縮後以 Fractogel^(R) TSK HW 55 進行不容性層析得一個對稱之尖峯 (圖 6)。取

此尖峯之中央部份，經濃縮後以標準之抗牛 IgG₁ 及 IgG₂ 抗血清反應，結果僅與抗 IgG₂ 之抗血清反應，不與抗 IgG₁ 之抗血清反應，再以標準之抗牛全血清免疫電泳分析，得知為純化之 IgG₂ (圖 7)。

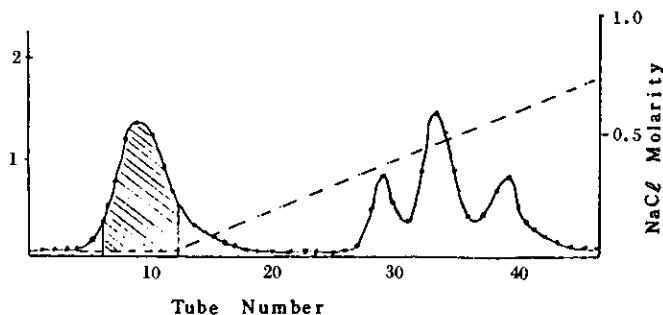


圖5 硫酸銨塩析後之牛血清球蛋白，經 DEAE cellulose 以線性塩類濃度遞增層析之曲線，陰影部份為回收之蛋白質，共 14 ml (3 × 20 cm)。

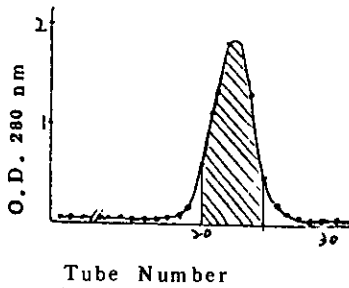


圖6 自圖5之離子交換樹脂層析所得之球蛋白再經 Fractogel^(R) TSK HW 55 不容性層析所得之結果，陰影部份為純 IgG₂，共 18ml，(2.5 × 100 cm)。



圖7 牛之全血清(s)，純化之牛 IgG₂ (G₂) 與不同種類之抗體進行免疫電泳試驗之結果。ABS = 抗牛全血清抗體；ABG₂ = 自製之抗牛 IgG₂ 抗體。

雞 IgG 之純化：

雞之血清經 30% 飽和硫酸銨沉澱所得之沉澱，透析後以 DEAE Cellulose 經 1M Urea，0.06M NaCl，0.01M Tris，

pH 8.0 之溶液層析，所得之蛋白質再經 Sephacryl S-300 色層分析，僅得 1 個尖峯 (圖 8)。取此尖峯之主要部份即為純 IgG (圖 9)。

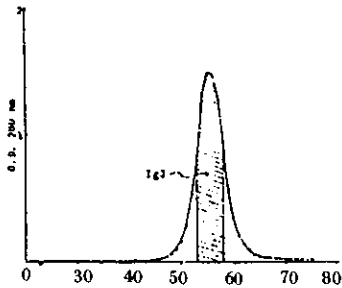


圖8 自 DEAE cellulose 離子交換樹脂層析所得之球蛋白經 Sephacryl S-300 層析所得之結果。斜線部份即為純 IgG。

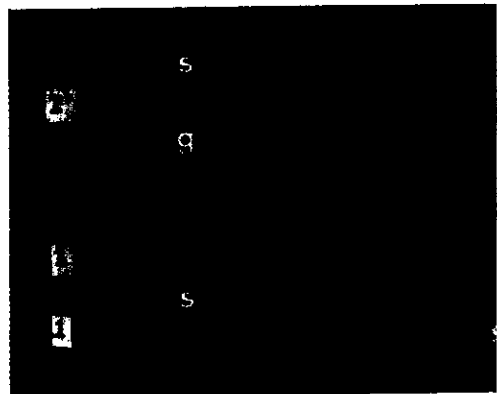


圖9 S : 雞血清
g : 純化之雞 IgG
1' : 抗雞全血清之抗體
1 : 抗雞 IgG 之抗體

討 論

本試驗中所純化之豬、牛、雞之 IgG 與抗豬、牛、雞之全血清之抗體做免疫電泳分析，得知僅出現一條沉澱線，再將進口之抗豬、牛、雞 IgG 抗血清，與自行純化之 IgG 做免疫電泳試驗，亦顯示二者之沉降線完全對稱，因此可知其為純 IgG 無誤^(3,5,9)。

動物由於個體之差異性及其所處環境之不同，血清中之抗體含量亦有不同⁽²⁾。同時操作者於純化時回收蛋白質尖峯之取捨亦相差很大，故回收量之差別也大⁽⁴⁾。

參 考 文 獻

1. 費昌勇、李永基 (1983) 雞血清中 IgG 和 IgM 之純化及其特異性抗體之製備。中華民國獸醫學會雜誌。9 : 119~124。
2. 林榮培 (1986) 牛藍舌病血清抗體快速測定法。台灣省畜衛試所研報 No 22 : 13~20。
3. 劉榮標 (1984) 獸醫微生物學，第一版，P. 625~642。國立編譯館。
4. 矢挽揮武・柏崎 守・波岡茂郎 (1973) 豚における Immunoglobulins IgG, IgA および IgM の分離精製について。日獸誌 35 : 189~208。
5. Hudson, L., F.C. Hay (1980) Practical Immunology. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications.
6. Lowe, C.R. (1978) An introduction to affinity chromatography. P. 344-399. In T.S. Work and E. Work (E.D.), laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 7, Part 2, 1st ed., Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
7. Poll G. et al. (1982) Bluetongue Virus: Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay, immunodiffusion and serum neutralization for detection of viral antibodies. Journal of Clinical Microbiology. Jan:159:162.
8. Porter, P. and D.E. Noakes, (1970) Immunoglobulin IgA in bovine serum and external secretions. Biochem. Biophys. Acta. 214:107-116.
9. Roitt, I.M. (1980) Essential Immunology, 4th ed. Blackwell Scientific Publications.
10. Schreiner, J.E. and A.J. Pesce. (1974) Immunochemistry. p.97-127. In J.M. Brewer, A.J. Pesce, R.B. Ashworth (E.D.), Experimental Techniques in Biochemistry, 1st ed., Prentice-Hall.
11. Wklkinson, P.C. and V.I. French. (1969) Antigenic heterogeneity of chicken 7s immunoglobulin. Immunochemistry 6:498-501.
12. Reif, A.E. (1969) Batch preparation of rabbit IgG globulin with DEAE cellulose. Immunochemistry 6:723-731.

The Methods for the Preparation of Immunoglobulin G from Bovine Swine or Chicken Sera

Lin, Y.P. C.Y. Fei, T.S. Huang, Y.S. Lu, and P.H. Mar*

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

The swine IgG was isolated from whole swine serum by Salt Precipitation (50% $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$), DEAE-chromatography, gel filtration and DEAE-cellulose chromatography performed on salt.

Bovine IgG2 was purified by salt precipitation ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), DEAE-cellulose chromatography and Fractogel TSK HW55 gel filtration.

Chicken IgG was purified from chicken whole serum with salt precipitation (30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), DEAE-cellulose and sephacryl S-300.

* National Taipei College Of Nursing.