

## 鴨血清免疫球蛋白IgG之分離及其特異性抗血清之製作

費昌勇 黃天祥 張本恒<sup>1</sup> 劉瑞生<sup>1</sup> 馬屏禾<sup>2</sup>

### 台灣省家畜衛生試驗所

以吾人自行純化之豬 IgG 免疫鴨，得鴨抗豬 IgG 之抗血清。將此抗血清經不溶性色層處理，取得 7~8 S 部分之蛋白質後通過接有豬 IgG 之 Sepharose CL-4B，使抗豬 IgG 之鴨免疫球蛋白得以吸附於 Sepharose CL-4B 之上。再以 pH 2.5 之 Glycine buffer 解離鴨免疫球蛋白，取得之鴨免疫球蛋白以抗鴨全血清之抗體做免疫電泳分析鑑定，得知其為十分純之鴨 IgG。將此鴨 IgG 免疫家免後所得之抗血清，再與鴨全血清做免疫電泳分析，亦僅得一條對稱之沈降線。

養鴨科學是我國在世界上獨樹一幟之科技研究。無論就品種改良亦或疾病研究，均有十分獨到之成績。就其產量而言民國 71 年共生產三千五百萬隻肉鴨及四億五千萬隻蛋鴨供國人食用。一千七百萬隻孵蛋鴨，五百萬個加工蛋，及二百五十萬公斤之羽毛出口。養鴨事業促進了農村之富裕，更為國家賺進可觀之外匯。究其原因，不外乎是政府對科技研究之重視及輔導農民之成功。

由於科技之日新月異，診斷方法亦不斷改進，在鴨病之疾病診斷方法目前尚未進展到利用酵素免疫吸附分析法 (ELISA) 研究之技術。此乃尚無抗鴨免疫球蛋白抗體問世之故。

在鴨免疫球蛋白純化之研究方面，國外之研究報告不多。Grey<sup>(2,3)</sup> 曾以生化之電泳方法純化得 IgG，Toth 和 Norcross<sup>(6)</sup> 亦以刮取免疫電泳法凝膠內之沈澱線來純化鴨免疫球蛋白。本文則使用免疫方法，併用親和性色層

分析之技術來純化其免疫球蛋白。方法是以豬之 IgG 免疫鴨，取得鴨抗豬 IgG 之抗血清後，利用接有豬 IgG 之 Sepharose CL-4B 進行親和性色層分析，以取得鴨之免疫球蛋白。

### 材料與方法

鴨抗豬 IgG 抗體之研製：

取吾人等自行純化之豬 IgG<sup>(1)</sup> 4 mg，以 0.5 ml PBS 溶解後加 0.5 ml 之 Freund 完全佐劑，充份混合製成乳劑，然後於鴨之大腿肌肉多處行少量注射，二週後取 2 mg，以 0.5 ml PBS 溶解後加 0.5 ml 之 Freund 不完全佐劑，充分混合製成乳劑後依同法補強注射。每兩週補強一次，待至力價達 64 倍以上後放血，取血清。本試驗共用 10 隻鴨供免疫注射，並獲免疫血清 350 ml。

親和性色層分析<sup>(4)</sup>：

取 50 ml 之 Sepharose CL-4B (Ph-

amacia 公司出品)，用 2M NaOH 調至 pH  $11.3 \pm 0.2$  時加溶於 30 ml 蒸餾水之 Cyanogen bromide 1.5 g 以進行其活化反應。反應時 pH 維持在  $11.3 \pm 0.2$ 。待酸鹼度穩定，反應完成後，立即以 Borate Saline Buffer 洗，然後與溶於 Borate Saline Buffer 之豬 IgG 300 mg 進行結合，經室溫搖盪反應 4 小時後完成。反應液加  $\text{NaN}_3$  至 1M 濃度，置  $4^\circ\text{C}$  一夜，翌晨取出，裝在層析柱內，以 1,000 ml PBS 洗淨後備用。

鴨免疫球蛋白之分離：

取鴨抗豬 IgG 之血清 350 ml，先經 40% 飽和度之硫酸銨鹽析，再以 Sephacryl S-300 層析，取 7~8 S 部分之蛋白質，再通過含豬 IgG 之 Sepharose CL-4B 層析柱，使鴨之抗體吸附在豬之 IgG 上，再以 0.1 M, pH 2.5 之 Glycine-HCl buffer 洗下附於層析柱上之鴨抗體。將洗下之鴨抗體與豬之 IgG 進行凝膠沈降試驗以測定其抗豬 IgG 之特异性。如此即得鴨免疫球蛋白。

抗鴨免疫球蛋白及抗鴨全血清等抗血清之製造：

取鴨免疫球蛋白 4 mg，溶於 0.5 ml 之 PBS 中，加等量之 Freund 完全佐劑，充分混和成乳劑後於兔體全身各處肌肉行少量注射。2 週後再取 2 mg 鴨免疫球蛋白，溶於 0.5 ml 之 PBS 中，加等量之 Freund 不完全佐劑

，製成乳劑後於兔之背部多處行皮內補強注射。以後每 2 週補強一次。待力價達 64 倍以上即放血，收集血清，置  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中備用。

兔抗鴨全血清之製造仿上，第一次免疫時用 0.3 ml 之鴨血清加 Freund 完全佐劑，做兔體肌肉注射，補強免疫時用 0.2 ml 之鴨血清加 Freund 不完全佐劑做皮內注射。抗血清之力價達 64 倍以上時放血，收集血清，置  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中備用。

免疫電泳分析法<sup>(4)</sup>：

取 1 g 凝膠 (Agarose)，加蒸餾水 50 ml，經煮沸完全溶解後加 50 ml 之 Barbitol buffer，充分攪拌後加於玻璃片上，待凝固後挖洞，加抗原，以 Barbitol buffer 電泳，電壓 90 伏。待指示色素 (Bromophenol blue) 達適當位置後即停止電泳，加抗體，於室溫中進行抗體抗原反應，翌晨取出，以 5,000 ml PBS 透析 2 次，覆以濕濾紙，於室溫中乾燥後即染色。以 1% 之 Amido Black 染色 1 小時，然後以 1% 之醋酸脫色 1 小時。

## 結 果

豬之 IgG 經免疫鴨 3 個月後，可得 64 倍以上之抗體力價。將鴨血，製成血清，並經 Sephacryl S-300 層析 (圖 1)，取得 7~8 S 部分之蛋白質後，即進行親和性色層分析

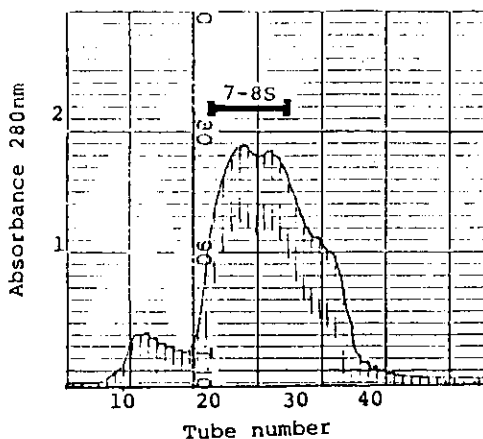


圖 1 鴨抗豬 IgG 血清 50 ml 經硫酸銨鹽析後，再經 S-300 不容性色層分析 ( $2.5 \times 100\text{cm}$ ) 之圖形。標幟 7~8 S 部分為回收部分。每管所含液體量為 8 ml。

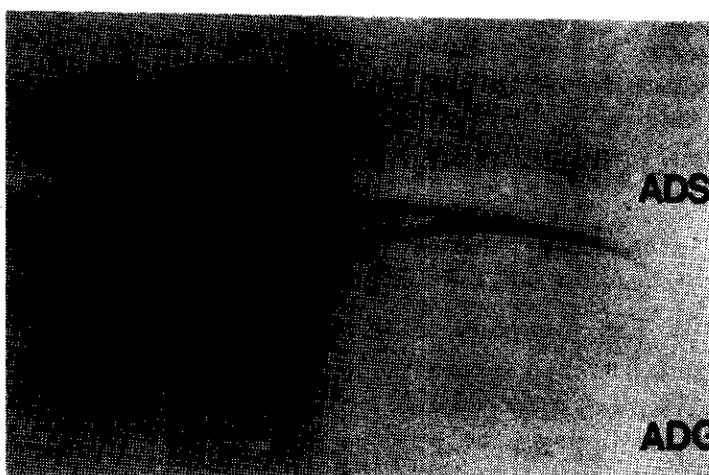


圖2 鴨血清(s)，純化之鴨 IgG(g)，與抗鴨全血清 (ADS) 及吾人自製之抗鴨 IgG (ADG) 抗血清之免疫電泳分析圖。

，共得 127 mg 之鴨免疫球蛋白。經以抗鴨全血清之抗血清以免疫電泳分析後，僅得一條沈降線 (圖 2)。故知為已純化之 IgG。此外，將此已純化之 IgG，再免疫家兔，所得之抗血清，與鴨之全血清進行免疫電泳分析後僅得一條沈降線 (圖 2)。故知為抗鴨 IgG 之抗血清無誤。

## 討 論

鴨免疫球蛋白在世界上研究之資料並不多。根據 Grey<sup>(2,3)</sup> 之研究，鴨 IgG 之沈降值為 7.8 S。本研究並未進行沈降值之測定，但根據免疫電泳之測定，其沈降線出現之位置與 Grey<sup>(2)</sup> 所述者同。此外，由於本試驗係以抗原抗體吸附 (Immunoabsorbance) 之親和性色層分析來純化免疫球蛋白，鴨血清中之抗豬 IgG 抗體必定會與接有豬 IgG 之 Sepharose - CL - 4 B 接合，因此以酸將接合於其上之鴨抗豬 IgG 抗體洗下後即為鴨之免疫球蛋白，且此洗下之鴨免疫球蛋白亦復經凝膠沈降試驗證實可與豬之 IgG 反應 (結果略)。本試驗所使用之方法及步驟十分簡便，不須特殊之生化設備即可完成。此外，由於吾人在進行親和性色層分析前已將鴨之血清以不溶性色層分析處理，取得 7 ~ 8 S 部分，因此取得之抗

體應為 IgG 一種。此經免疫電泳分析後亦證實此點。

Grey<sup>(2,3)</sup> 所用之純化方法係直接以電泳 (Zone electrophoresis) 來純化鴨 IgG。此法係利用 IgG 之帶電量與其他血清蛋白質帶電量之差異來分離 IgG。筆者等曾以線性濃度遞增之離子交換樹脂純化鴨球蛋白，此法亦為利用其帶電量差異純化蛋白質之方法，結果發現鴨 IgG 之帶電量與其他血清球蛋白差異不大，故放棄利用帶電量之差異來純化鴨 IgG。又 Toth 和 Norcross<sup>(6)</sup> 係利用免疫電泳在凝膠中之沈澱線，將沈澱線部分之凝膠挖下來以為抗原。此點雖準，但一次電泳操做僅能處理 0.01mg 之量，不適宜生產，故亦放棄此法。

本研究係純化免疫球蛋白之另一種方法。其模式可適用於任何動物。只要取一種蛋白質，免疫該種動物，待產生抗體後，再用親和性色層分析，即可得到該種動物之免疫球蛋白。試驗設計之適用性甚廣，且生產量大，操作便利。尤其是對目前尚無免疫球蛋白純化方法之動物 (如鴨、鵝)，更可使用此法進行分離。此外，目前抗鴨免疫球蛋白抗體尚未問世，欲使用 ELISA 分析鴨病者，即可引用本文之方法進行二次抗體之製造。

### 參考文獻

1. 費昌勇、黃天祥、賴秀穗、邱仕炎。1986。豬免疫球蛋白 IgG 及 IgM 特異性抗體之簡易生產法。中華民國獸醫學會雜誌 12 : 99-105。
2. Grey, H.M. 1967. Duck immunoglobulins I. Structural studies in a 5.7S and 7.8S  $\gamma$ -globulin. J. Immunol. 98:811-819.
3. Grey, H. M. 1967. Duck immunoglobulins II Biologic and immunochemical studies. J. Immunol. 98:820-826.
4. Hudson, L. and F. C. Hay. 1980. Practical Immunology. 2nd ed., Blackwell Scientific Publications.
5. 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.
6. Toth, T.E. and N.L. Norcross. 1980. Immuno-electrophoresis of duck sera and immunoglobulins. Avian Dis. 25:1-10.

## THE PURIFICATION OF DUCK IgG AND THE PRODUCTION OF ITS ANTISERUM

Andrew C.Y. Fei , T.S. Huang , P.H. Chang<sup>1</sup>

Michael R.S. Liu<sup>1</sup>, P.H. Mar<sup>2</sup>

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

Ten ducks were highly immunized with purified swine IgG. The anti-swine IgG antiserum, 350ml from the ten immunized ducks, was salted out at 40% saturation in ammonium sulfate and then chromatographed through Sephacryl S-300 column. The 7S and 8S serum globulins were collected and absorbed with Sepharose CL-4B conjugated by swine IgG. The duck anti-swine IgG antibody absorbed in the affinity column was desorbed by 0.1M glycine buffer, pH 2.5. Only one precipitation line of the desorbed duck immunoglobulin was observed when tested in immunoelectrophoresis against rabbit anti-duck whole serum antiserum. This would suggest that the immunoglobulin isolated in this manner in the duck IgG according to the location of the precipitation line in the immunoelectrophoresis analysis. Anti-duck IgG antiserum was raised by injecting a rabbit with the isolated duck IgG. Only one precipitation line of the anti-duck IgG antiserum when tested in immunoelectrophoresis against duck whole serum.

---

1. Dept. Veterinary Medicine, College of Agriculture, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, R.O.C.

2. National Taipei College of Nursing