

鷄免疫球蛋白IgA之純化及其 抗血清之簡易生產法

費 昌 勇

台灣省家畜衛生試驗所

鷄膽汁中之 IgA，經陰離子交換樹脂初步純化，去除 IgA 及 IgM 後，即以免抗鷄 IgA 之抗血清與膽汁中之 IgA 進行試管沈降試驗。將所得之沈降物免疫兔後即得免抗鷄 IgA (H+L) 之抗血清。再將此抗血清以接有鷄 IgM 之 Sepharose CL-4B 吸收後，即得抗鷄 IgA (H) 之抗血清。本文重點為利用抗體抗原之特異性以簡化 IgA 之純化步驟。

關於鷄免疫球蛋白之純化及其特性之研究報告甚多，^(1, 4, 6-13) 目前已知的免疫球蛋白種類共有 IgG、IgM 及 IgA 三種。其中 IgG 及 IgM，筆者已完成其純化之研究。⁽¹⁾ 至於 IgA，目前已知在鷄血清中有 7S 及 15S 兩種，腸道與膽汁中僅 15S 一種；至於血清中之 15S IgA 與膽汁中之 15S IgA 則完全相同。⁽¹¹⁾ IgA 由於分子量變化大，且在血清或膽汁中分子帶電量之種類及分佈均廣，故極不易純化。前人之報告^(6, 7, 11) 均使用操作手續複雜且回收量亦低之電泳或等電點分析法。本文則利用抗體抗原之試管沈降法⁽²⁾ 來純化鷄之 IgA。本法之原則係：1. 去除膽汁中之 IgG 及 IgM，保留膽汁中之 IgA；2. 將此含 IgA 之膽汁與免抗鷄 IgG 之抗血清進行試管沈降反應，以取得大量之抗體抗原沉澱；3. 將此含 IgA 之沉澱物藉離心法與其他雜物分開，再免疫兔子，以得到抗鷄 IgA 之抗血清。本法會成功地應用於豬 IgM 抗血清之研製。⁽²⁾

材料與方法

鷄膽汁

白色來亨肉雞，剖解後以注射針吸取膽汁，共 500 ml 膽汁。

免抗鷄 IgG 抗血清

筆者等自行研製。⁽¹⁾

鷄 IgA 之初步純化⁽⁶⁾

鷄膽汁先以含 2% 氯化鈉之 0.1M，pH 4.6 之 Acetate buffer (0.2M 醋酸加等體積之 0.2M 醋酸鈉，略調 pH 即成)，充份透析後以 5,000 rpm 離心 30 min. 去除 mucin 等沉澱物。上清液以 DEAE Sepharose CL-6B 陰離子交換樹脂處理，以去除 IgG、IgM，並初步純化 IgA。⁽⁶⁾ 樹脂之平衡液為 0.01M Tris，pH 8.0，0.12M NaCl。上述膽汁亦先以此液透析，然後倒入分離柱，進行階梯式層析：第一次用上述之樹脂平衡液層析，流出之蛋白質丟棄，第二次用 0.01M Tris，pH 8.0，0.3M NaCl 之溶液層析，所得之蛋白質先以 PBS 透析，再以 40% 飽和度之硫酸銨濃縮，沉澱之蛋白質再以 PBS 透析後即為初步純化之 IgA。

免疫電泳分析

按費等⁽²⁾ 之方法實施，其試驗設計見圖 1。

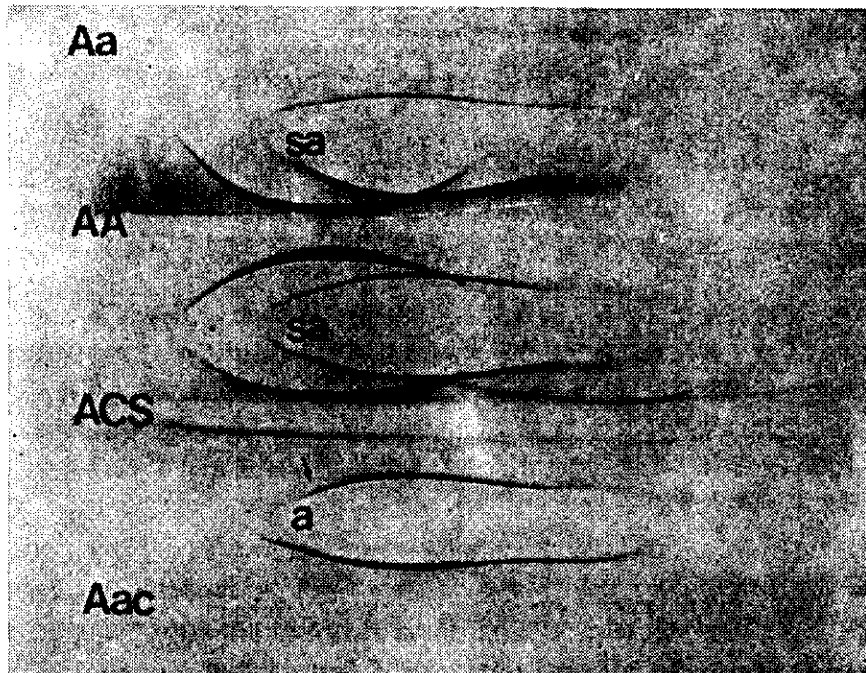


圖 1 吾人自雞膽汁中初步純化之 IgA 與吾人自製抗雞 IgA 抗血清之免疫電泳分析圖。其中 a = 吾人初步純化之 IgA, sa = 雞血清 + 初步純化之 IgA, Aac = 進口之抗雞 IgA 重鏈抗血清, ACS = 抗雞全血清之抗血清, AA = 吾人自行製備之雞 IgA 抗血清, Aa = 經 IgM 吸收後之 AA (即抗 IgA 重鏈抗體)。

兔抗雞 IgG 抗體與雞 IgA 最適沉降比之測定⁽²⁾

取筆者初步純化之雞 IgA 按 3 倍指數稀釋—1 至—6, 每個稀釋倍數取 0.5 ml, 與不稀釋之抗雞 IgG 抗血清 0.5 ml 等量混合於試管中。於冰箱中過夜反應。翌晨取各試管之上清液, 按圖 2 之設計測定抗體抗原之最適點 (equivalent point)。

抗雞 IgA 抗體之研製

將初步純化之雞 IgA 按 Bradford⁽³⁾ 法定量後取 4 mg, 按抗原抗體最適比加適量之抗體, 取格子沉澱以 PBS 經 3,000 rpm, 30min 洗 3 次後, 加 Freund 完全及不完全佐劑, 按費等⁽²⁾ 所述之方法免疫家兔。所得之血清為兔抗雞 IgA (H+L) 抗血清。再將此抗血清按費與李⁽¹⁾ 之方法, 將此抗血清通過接有 IgM 之 Sepharose CL-4B, 即可去除抗雞 IgA 之輕鏈抗體 [IgA(L)],

而得抗雞 IgA 重鏈抗體 [IgA(H)] (圖 1)。

結 果

雞 IgA 之免疫電泳分析

自膽汁初步純化所得之 IgA 經與抗雞全血清之抗血清進行免疫電泳分析後出現一條沉降線, 在該沉降線陰極端有一極 (圖 1 箭頭顯示) IgA 之副沉降線 (Partial identical)。顯示此初步純化之 IgA 未含有 IgG 及 IgM, 且對雞之全血清而言, 為一純物質。每 100 ml 膽汁經初步純化後可得約 120mg 之粗製 IgA。

兔抗雞 IgA 抗血清之研製

初步純化之雞 IgA, 與兔抗雞 IgG 抗體, 經試管沉降反應後, 進行凝膠沉降試驗, 結果如圖 2, 其中小箭頭為 IgA 之沉降線, 大箭頭為 IgG 等之沉降線, 得知 IgA 與雞

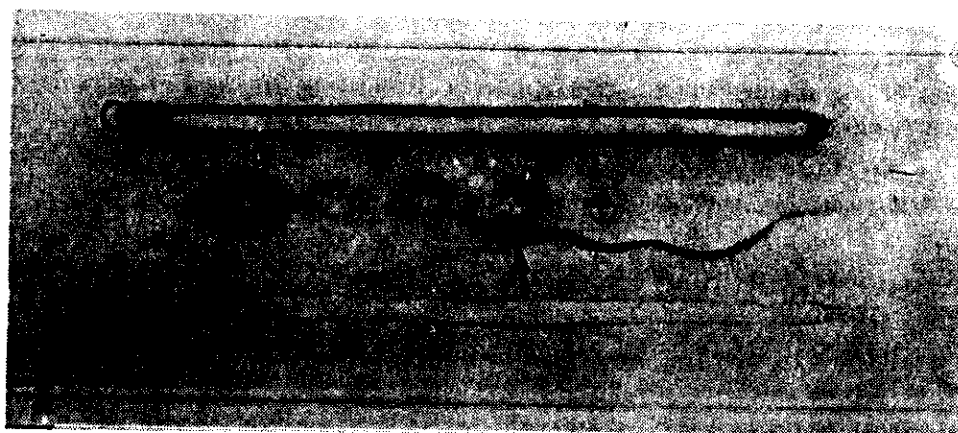


圖2 吾人初步純化之雞 Ig A 與雞 Ig G 抗血清最適比 (equivalence) 之測定。圖中之孔 (wells)，自右至左依次為雞 Ig A 之 3 倍稀釋液，與等量之抗雞 Ig G (H+L) 抗血清於試管內作用後之上清液。圖中之溝：CS = 雞血清。Aac = 進口之抗雞 Ig A 重鏈抗血清。圖中小箭頭顯示 Ig A 之沈降線，大箭頭顯示孔中過剩之雞 Ig A 抗血清與雞血清中免疫球蛋白之沈降線，故此兩條沈降線有部份相同 (partial identical) 抗原之馬刺 (Spur) 狀出現。

Ig G 抗血清之最適比 (equivalence) 為 3^{-8} 。故定 27 倍為抗原最適稀釋倍數，抗體不稀釋。茲取 4 mg 之 Ig A 初步純化抗原，經稀釋 27 倍後與等量之抗雞 Ig G 血清混合。抗體抗原之格子沉澱以 PBS 洗 3 次後，再免疫兔子，按費等⁽²⁾之方法，經 3 個月時間之免疫後，可得抗雞 Ig A 之抗血清。此抗血清不但與雞血清中之 Ig A 反應，亦可與雞血清中之 Ig G 反應。經接有 Ig M 之 Sepharose CL-4 B 吸收後，抗輕鏈抗體不復存在，僅餘抗 Ig A 之重鏈抗體，故亦不與血清中之 Ig G 發生反應 (圖 1)。

討 論

關於雞 Ig A 之純化，Lebacq 等⁽⁷⁾人雖已自膽汁中純化，但 porter⁽¹¹⁾重覆 Lebacq 等人之實驗後指出彼等所純化之 Ig A 尚不純。經 porter⁽¹¹⁾以等電點電泳處理後方得到真正純化之雞 Ig A。筆者純化 Ig A 時，並未仿上述作者所用之方法來純化 Ig A，而是應用抗體與抗原高特異性結合反應之功能，自初步純化之膽汁中直接取得雞 Ig A 之分子。其理論基礎如下：雞免疫球蛋白之輕鏈有 λ

和 K 兩種，但 95% 以上之雞抗體均只含 λ 一種輕鏈。⁽⁴⁾ 故抗雞 Ig G 之抗輕鏈抗體能夠與雞 Ig A 之輕鏈反應。由圖 1 可知，吾人自膽汁中初步純化之 Ig A 已不含免疫球蛋白 Ig G 與 Ig M，此乃由於膽汁經陰離子交換樹脂層析時，二者已被 0.12 M NaCl 溶液洗淨。⁽⁶⁾ 至於 Ig A 之沈降線中所出現之副沈降線 (圖 1)，無論其來源為何，均非 Ig G 或 Ig M。故仍可用抗輕鏈抗體做 Ig A 之回收處理。故當雞 Ig G 之抗輕鏈抗體與吾人自膽汁中粗製之 Ig A 作用時，僅 Ig A 可與之發生格子沉澱，因此無論膽汁中其他蛋白質之成份如何複雜，均可利用免疫抗體之高度特異性取得 Ig A，由於雞之 Ig G 自血清中極易純化，欲得兔抗雞 Ig G (H+L) 之抗血清十分容易，因而能以此法達到簡易生產之目的。至於雞之 Ig A 與抗雞 Ig A 之抗體形成沉澱後，是否雞 Ig A 分子輕鏈之 isotypic antigen 會被兔之抗體遮蔽，而無法發揮抗原之效果等問題，已在前篇⁽²⁾討論，茲不贅述。

另一重要問題應在此討論者為：是否雞膽汁中 Ig A 含分泌片 (Secretory piece)? 許多學者^(10,12,13)之研究均認為雞膽汁中之

IgA 不含分泌片。彼等將自膽汁中純化之 IgA 以 gel electrophoresis 分析，並未發現含分泌片。但 porter⁽¹¹⁾ 自無菌雞之腸道中分離出分泌片，而該雞之腸道中並無免疫細胞 (immunocyte)，顯示雞之分泌片為一與 α 鏈完全獨立之分泌系統，此點與一般哺乳類不同。

此外 porter⁽¹¹⁾ 自膽汁中經等電點電泳純化所得之 IgA，經免疫家兔所得之抗血清，亦不與分泌片發生反應，顯示分泌片與 IgA 之結合力極弱。但在生理上，筆者相信分泌片之存在應仍具有協助 IgA 抗毒素之功能。此外，Vaerman 等⁽¹²⁾ 亦發現雞膽汁中 IgA 之輕鏈與重鏈間之接合並無 S-S 鏈 (disulfide bond)，而是非共價鏈之接合，故在高鹽環境下 (如 5 M guanidine 或 8M 尿素) 二者可自行分開，此現象與人 IgA₂ 之生化特性相似。⁽⁵⁾ 但在生理條件下並不影響其免疫功能，二者亦不會分開，故吾人仍能以抗輕鏈抗體取得其 IgA 整個分子。

本研究係繼續 IgM 特異性抗血清之研製⁽²⁾ 後，又一利用抗體抗原之高特異性結合功能以完成節約操作手續及簡易生產目的之一例。

參考文獻

1. 費昌勇、李永基。1983。雞免疫球蛋白 IgG 及 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. 費昌勇、黃天祥、賴秀穗、邱仕炎。1986。豬免疫球蛋白 IgG 及 IgM 特異性抗血清之簡易生產法。中華民國獸醫學會雜誌 13 卷 (編印中)。
3. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
4. Grant, A., B. Sanders and L. Hood. 1971. Partial amino acid sequences of chicken and turkey immunoglobulin light chains. Homology with mammalian chains. *Biochemistry* 10: 3123-3132.
5. Grey, H. M., C. A. Abel, W. J. Yount and H. G. Kunkel. 1968. A subclass of human λ A-globulins (λ A2) which lacks the disulfide bonds linking heavy and light chains. *J. Exp. Med.* 128:1223-1236.
6. Lebacqz, A. M. 1979. Purification and testing of class-specific anti-chicken immunoglobulin antibodies. *J. Immunol. Methods* 25:101-117.
7. Lebacqz-Verheyden, A. M. J. P. Vaerman and J. F. Heremans. 1972. A possible homologue of mammalian IgA in chicken serum and secretions. *Immunology* 22:165-175.
8. Lebacqz-Verheyden, A. M., J. P. Vaerman and J. F. Heremans. 1974. Quantification and distribution of chicken immunoglobulins IgA, IgM and IgG in serum and secretions. *Immunology* 27:683-692.
9. Leslie, G. A. and L. W. Clem. 1969. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. *J. Exp. Med.* 130: 1337-1352.
10. Orlans, E. and M. E. Rose. 1972. An IgA-like Immunoglobulin in the fowl. *Immunochemistry* 9:833-838.
11. Porter, P., S. H. Parry. 1976. Further characterization of IgA in chicken serum and secretions with evidence of a possible analogue of mammalian secretory component. *Immunology* 31:407-415.
12. Vaerman, J. P., A. M. Lebacqz-Verheyden and J. F. Heremans. 1974. Absence of disulfide bridges between heavy and light chains in IgA from

- chicken bile. *Immunol. Commun.* 3:239-247.
13. Watanabe, H. and K. Kobayashi. 1974. Peculiar secretory IgA system identified in chickens. *J. Immunol.* 113:1405-1410.

A SIMPLE METHOD FOR THE PRODUCTION OF ANTI-CHICKEN IgA ANTISERUM

Andrew Chang-Yung Fei

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

Fifty ml of chicken bile was initially dialyzed against against butter followed by buffered saline, and chromatographed on DEAE dialyzed column. The majority of biliary IgA was eluted with 0.3M NaCl and further dialyzed against PBS. The crude biliary IgA was precipitated with rabbit anti-chicken IgG antiserum. The water-

insoluble lattice precipitate was washed with PBS. Rabbit anti-chicken IgA(H+L) antiserum was produced by the injection of rabbit with the washed lattice precipitate emulsified with adjuvants. The antiserum was absorbed with Sepharose CL-4B conjugated by pure IgM to obtain anti-IgA(H) antiserum.