

抗猪免疫球蛋白G 抗血清之簡易生產法

費昌勇 黃天祥 林敬覆

林榮培 曹素華

台灣省家畜衛生試驗所

以進口之兔抗猪 IgG 抗血清與猪全血清進行試管沈降試驗，所得之沈澱再免疫家兔，可得抗猪 IgG 之抗血清。將此種抗血清和猪血清進行免疫電泳分析顯示其沉降線與進口之猪 IgG 抗血清相同。以此抗血清與進口之抗猪 IgG 抗血清對猪之全血清進行凝膠沈降試驗，顯示此兩類抗血清之特異性無異。以試管沈降反應所得之沈澱免疫家兔後顯示此非水溶性之沈澱為一十分優良之抗原，免疫性甚高。本法提供了簡易、廉價而快速之特異性抗體生產法。應用此原則可生產各種動物之特異性抗血清，供國內同仁使用。

猪免疫球蛋白之抗血清是從事猪病研究所不可缺少之材料。目前雖然歐美等國均有生產並發展成商品，但價格昂貴，購買期貨緩慢，影響研究至鉅。目前本省猪病研究上之須要量極大，實有自行生產之必要。欲生產此類抗體必須先自行純化此三種免疫球蛋白，其所須之技術雖不外乎塩析、離子色層分析 (ion exchange) 及不容性色層分析 (Gel filtration)^(1,2,3,4)，但必須耗費相當程度之成本及時間。三種免疫球蛋白中，筆者已完成 IgG 之純化，至於 IgM 及 IgA 之純化，雖已有相當進展，但尚未達到商品之水準。

由於抗體抗原之反應是特異性甚強之反應。故筆者認為特異性抗體和不純之粗抗原在試管中進行沈降反應，所得之沈降物應該是只含有此特異性抗體之抗原，和該抗原之抗體兩種物質。據此，可自不純之粗抗原中獲得十分純之抗原，此即為十分優良之製造抗血清之材料。故筆者以猪之 IgG 為例，以進口之兔抗猪 IgG 抗血清，直接與猪之全血清進行試管沈降反應，再由其所得之沈降物免疫家兔，得以製造特異性抗血清。

材料與方法

猪血清

屠宰場所收集之猪血清。

猪免疫球蛋白 IgG 之純化：

猪血清 100 ml 經 50% 飽和度之硫酸銨沉澱後以 0.01M, 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)，取得主尖峯蛋白質後，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峯即為純 IgG。上述之方法為筆者參考輝武等⁽⁵⁾ 人之方法並加修改而成。

凝膠沈降試驗：

按 Shreiner 和 Pesce⁽⁷⁾ 之方法實施：即以 0.85% 之 Agarose 置 Barbitol buffer (Sodium barbitol 5 g, sodium acetate (3H₂O) 3.25 g, calcium lactate 0.384 g, distilled water 100 ml, pH 8.6) 溶液加熱溶解。取 2 ml 覆於顯微鏡用之載玻片上，冷卻後打洞。sealing agar 及 precoating agar 均為溶於蒸餾水之 0.3% Agarose。

免疫電泳法：

按 Schreiner 和 Pesce⁽⁷⁾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 100 mV，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。試管沉降試驗⁽⁴⁾：

豬血清以含 0.2 % NaN₃ 之 PBS 做 4 倍階段稀釋，自 4⁻¹ 至 4⁻¹⁰。將這些不同稀釋倍數之豬血清各取 1 ml，置試管中，每支試管分別加進口且未加稀釋之抗 IgG 抗血清* 0.1 ml。充分混合後置 37 °C 過夜。翌晨取出觀察。

抗體抗原最適比例之測定^(4,6)：

將上述抗體抗原反應後之試管，以 3,000 rpm 離心 30 min。然後取上清液，按豬血清之稀釋次序與抗豬 IgG 之抗血清及 10 倍稀釋之豬血清做凝膠沉降試驗（圖 5），以測定抗體抗原之最適比（equivalent point）。

特異性抗血清之生產法⁽¹⁾：

取豬血清 1 ml，以 PBS 按上述抗體抗原最適比之結果適量稀釋後加適量進口之特異性抗豬 IgG 血清*，充分混合後置 37 °C 過夜。翌晨取出，以 PBS 經 3,000 rpm，30 min 連續洗 3 次，取沉澱，再用蒸餾水依同法洗一次後冷凍乾燥，然後以電動天平稱重。取 4 mg 加 0.5 ml PBS，與 0.5 ml 之 Freund 完全佐劑充份混合製成乳劑後取 1 kg 左右之家兔，於全身各處肌肉行少量注射。2 週後再取 2 mg 之沉澱，與 Freund 不完全佐劑充份混合後製成乳劑，於家兔之背部多處行皮內補強注射。以後每 2 週補強一次。每次行免疫注射時均採血製成血清，以凝膠沉降試驗測力價，觀察力價變化情形。

此外，取筆者所純化之 IgG 3 mg，加 Freund 完全佐劑行第一次免疫。補強時取 1.5 mg，加 Freund 不完全佐劑行補強免疫。免疫注射法及間隔時間同前。

結 果

豬 IgG 之純化：

豬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 min 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質以不容性色層分析 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）。此二尖峯經分別回收並以免疫電泳分析得知筆者純化之物質與抗豬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豬 IgG 抗血清，行凝膠沉降試驗，結果再出現明顯之沉降反應（圖 8）。故可證實筆者所純化之物質為純豬之 IgG 無誤。筆者每 100 ml 之豬血清可得 733 mg 之純 IgG。

豬血清經一系列之 4 倍稀釋後各取 1 ml，與 0.1 ml 之抗豬 IgG 抗血清作用後，各試管可見到不同量之白色沉澱（圖 4）。取這些試管之上清液，以 10 倍稀釋之豬血清和抗豬 IgG 之抗血清，用凝膠沉降試驗來測定試管上清液內所存在之剩餘抗體或抗原，以測定其抗體抗原之最適比（equivalent point）。由圖 5 可知抗體抗原之最適比在豬血清稀釋到 4⁻³ 至 4⁻⁴ 之間。自 4⁻¹ 至 4⁻³ 為抗原過剩，孔內之過剩抗原與下面含 IgG 抗血清之溝（ACPg）出現沉降線。自 4⁻⁴ 開始為抗體過剩，孔內之過剩抗體與上面溝內 10 倍稀釋之豬血清（CPS）出現沉降線。因此筆者定 4⁻³ 至

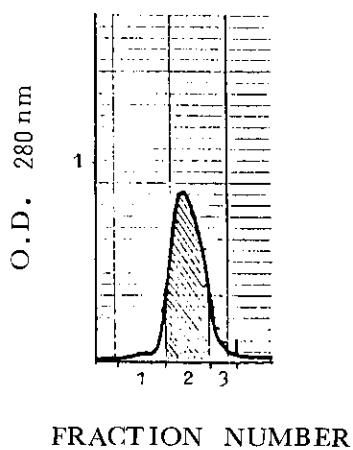


圖1 經硫酸銨鹽析及陰離子交換樹脂處理後之豬血清蛋白，經3次不容性色層分析之最後圖形。陰影部份為回收之蛋白質。

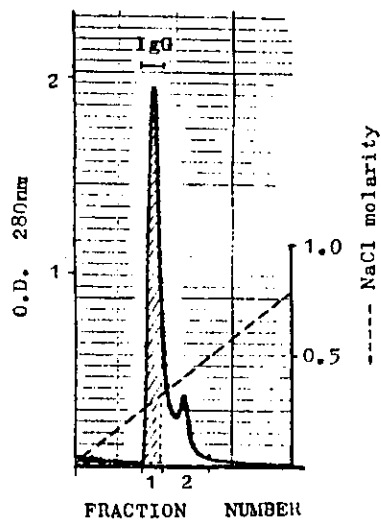


圖2 經圖1不容性色層分析後回收之血清蛋白，再以線性濃度遞增之陰離子交換樹脂層析之圖形。陰影為回收之蛋白質 (IgG)。

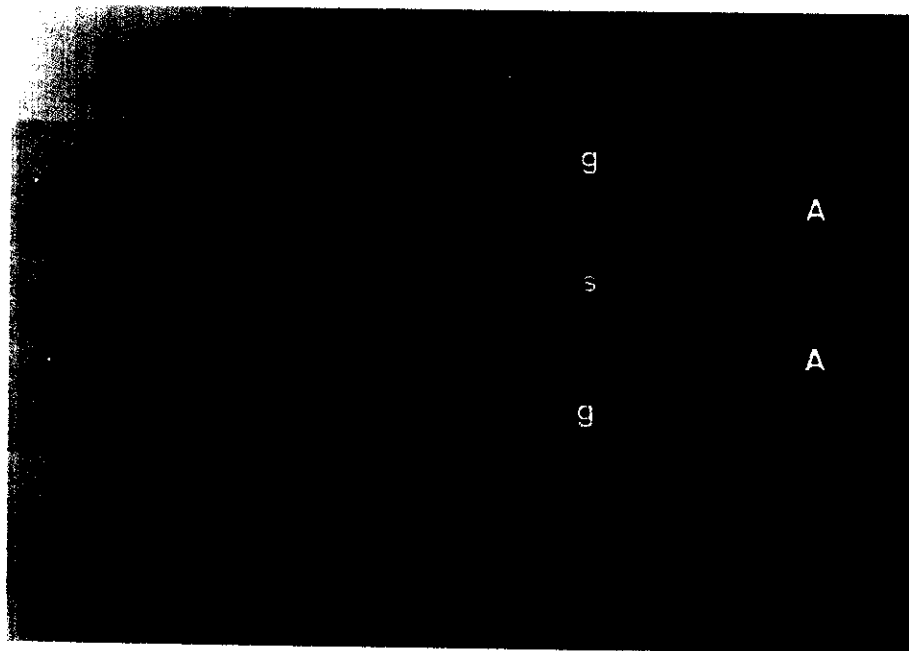


圖3 經純化後之 IgG (g) 以免疫電泳分析其純度。S：豬之全血清。上、下溝 (A) 內均為 抗豬全血清之抗血清。



圖4 自右至左以4倍階梯稀釋之猪血清與固定量之抗猪IgG抗血清經沈降反應後之結果

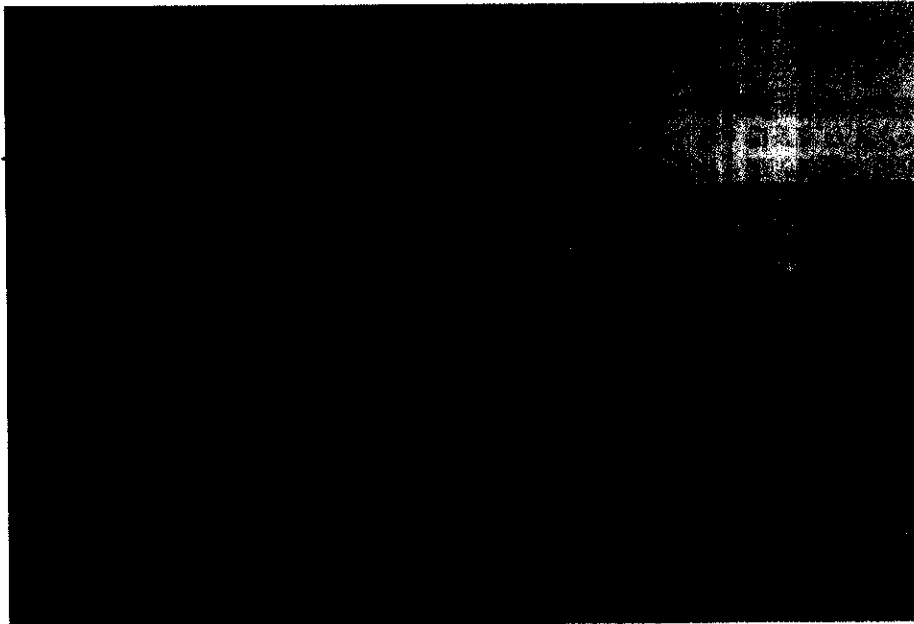


圖5 猪血清與抗猪IgG之抗血清試管沈降試驗(圖4)後之上清液置凝膠中央之孔內，再以10倍稀釋之猪血清(CPS)和抗猪IgG之抗血清(ACPg)測定抗體抗原之最適比(equivalence)。數字表示試管內猪血清之稀釋倍數。由圖可知其最適比應在 4^{-3} 至 4^{-4} 之間。

4^{-4} 之中間值，以100倍猪血清之稀釋倍數為抗原最適比之稀釋倍數，抗體為固定量，不稀釋。特異性抗血清之製造及力價測定：

根據上述之結果，吾人取1ml之血清，以PBS稀釋100倍後與10ml之進口特異性抗IgG之抗血清充份混合，置 37°C 過夜。翌晨取出以PBS洗3次後再以蒸餾水洗淨，然後冷凍乾燥。以電動天平秤重得知為48mg，取40mg按前述之方法免疫家兔10隻，補強時用量減半。每次免疫注射前抽血取血清，以凝膠沈降法測定抗血清力價。10隻家兔之血清等量混合在一起一次測定。另將筆者所純化之IgG 5ml(含20mg)按同法加5ml佐劑免疫家兔10隻，補強時用量減半。家兔經免疫後亦按時採血並測定力價。抗原用量視需要量生產。結果得表1。

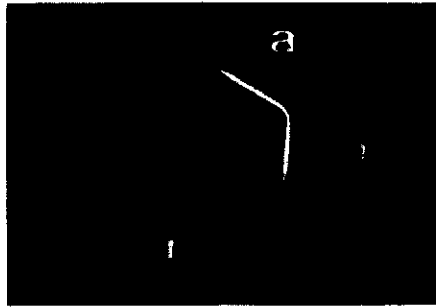


圖6 以凝膠沈降法測定抗體力價：中央之S為豬血清，自右上角a處開始，抗血清以2倍順時針稀釋。本例抗血清之力價為16倍(r)。

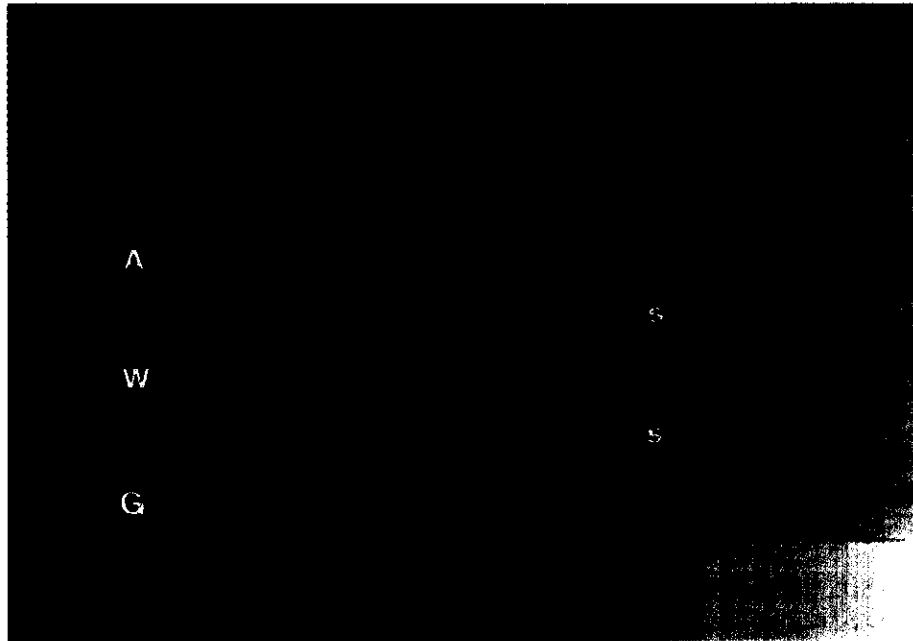


圖7 以試管沈降法取得之抗原免疫家兔取得之抗豬IgG抗體(A)，和進口抗豬IgG抗體(G)，與豬之全血清(s)之免疫電泳分析圖。中央之溝為抗豬全血清之抗血清(W)。

表1 水溶性IgG與非水溶性IgG-抗IgG抗體之試管內沉澱經免疫家兔後之力價變化

抗原種類	免疫次數(每2週免疫一次)						
	1	2	3	4	5	6	7
水溶性IgG	0	2	8	16	32	32	64
非水溶性沉澱	0	2	16	32	64	128	128

由表1得知，豬IgG和抗豬IgG抗體之沉澱物對家兔之免疫反應刺激，較水溶性IgG對家兔之免疫反應刺激要強。易言之，前者之免疫性較強。

特异性抗血清之免疫电泳分析及凝膠沉降分析：

非水溶性之猪 IgG 與抗猪 IgG 抗體之試管內沉澱經免疫家兔 3 個月後放血，血清經 56 °C，30 min 非働化後做免疫电泳分析，比較其與進口抗血清之特异性差異，結果如圖 7。由圖 7 可知經試管沉降之沉澱免疫家兔所得之抗血清與進口之抗 IgG 抗血清在免疫电泳分析之沉降線完全一致。二者均是以抗 IgG 之抗血清為主。另外出現之兩條沉降線應該是 IgM 和 IgA (圖 7)。

此外，再將上述之兩種抗血清與筆者自行純化之 IgG 與猪之全血清做抗體特异性比較，結果如圖 8。由圖 8 可知，筆者所純化之 IgG 與此兩種抗血清均能反應。此兩種抗血清與猪全血清之沉降線在交叉點上並無馬刺 (spur) 或交叉 (cross-over) 現象。故知其免疫學上之特异性完全相同 (identical)。



圖 8 以試管沉降試驗之抗體抗原結合沉澱之抗血清(1)和進口之抗猪 IgG 抗血清(2)，與猪之全血清(s)和筆者純化之 IgG(g) 經凝膠沉降試驗之反應結果。

討 論

一般而言，各種動物 IgG 之純化均不很困難⁽⁴⁾。筆者所純化之 IgG，與抗猪全血清之抗體做免疫电泳分析，得知僅出現一條沉澱線 (圖 3)。再將 IgG 與進口之抗猪 IgG 抗血清，做凝膠沉降試驗亦出現顯著之反應 (圖 8)，因此可知其為純 IgG 無誤。猪之 IgG 至目前所知共有 4 種亞族，即 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄^(2, 4, 6)。筆者所純化之 IgG 究竟是屬於那一種，尚不明瞭。但無論是那一種，均可與進口之抗猪 IgG 之抗血清反應，因為此四種亞族均含有 IgG 之共同抗原^(2, 4, 6)。

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。一般而言，每 100 ml 之猪血清約含 1,700 mg - 2,900 mg 之 IgG 分子⁽²⁾。筆者自屠宰場取得之 100 ml 之猪血清，經純化後回收 733 mg 之 IgG。輝武等⁽³⁾每 100 ml 猪血清可收回 675 mg 之 IgG。二者有差異。由於血清來源之差異很大，以及操作者純化 IgG 時，回收蛋白質尖峯 (peak) 之取捨亦相差很大，因此回收量之差別亦大。

任何豬之 IgG 分子，當用於免疫其他動物時，所產生之抗體種類可謂錯綜複雜。但吾人可大致將其分成三類^(2,6)討論：(一) Isotype，此類抗體是針對 IgG 之重鏈 (heavy chain) 及輕鏈 (light chain) 之固有區 (constant region) 及部份變異區 (variable region) 之抗體。此乃同種動物之 IgG 所共同具有之結構。這種結構在重鏈上可分別成族 (class) 和亞族 (subclass) 等類之結構，在輕鏈上則可分別成型 (type) 和亞型 (subtype) 等結構。無論任何一隻豬，其 IgG 均含有此類結構。而對抗此部份之抗體，一般進口市售之抗血清，亦屬此類。此類抗體在防疫診斷 (EIA, RIA, IFA 等)，均屬必要之材料，十分重要。(二) allotype，此類結構是指不同豬之個體間因遺傳之差異，彼此在 IgG 分子上有某些結構上之差異。如將甲品系豬之 IgG 免疫乙品系豬，乙豬對甲豬 IgG 之 isotype 不會反應，但對甲之 allotype 就會反應。筆者用兔抗豬 IgG 之抗血清與豬之 IgG 所形成之沉降物免疫兔，就會發生此類抗體。但這種抗體與豬之 IgG 毫無關係，故對免疫診斷並無影響。(三) idiotype，這類結構是指抗體高度變異區 (hypervariable region) 之結構。此乃每一株 (clone) 抗體之高度變異區，均會因其對環境之異物所產生之抗體而有差異，這類結構所產生之抗體，亦不影響免疫診斷之結果。

由於以上之分析，吾人可知當豬之 IgG 分子於免疫家兔之後，其所產生之抗體種類十分複雜。就吾人之須要而言，是上述之第一類抗體。其他種類之抗體雖多，但並不影響防疫診斷之結果。

本文之重點是以抗體抗原之沉降物做為抗原免疫家兔。但豬之 IgG 當與抗豬 IgG 之抗體形成沉澱後，是否豬之 isotype 上之抗原會被兔之抗體遮蔽，而無法發揮抗原之效果，以致所產生之抗體沒有抗 isotype 之抗體？筆者認為此問題可從兩方面討論：(一) 抗體抗原之結晶格子必須形成，沉澱才會發生，但沉澱格子發生時，抗 IgG 之抗體不會將豬 IgG 上所有 isotype 抗原遮蔽。此外，由於所用之抗體是抗豬 IgG 之多株抗體 (polyclonal antibody)，豬 IgG 上之任何 isotype 部份均有可能與兔之抗體結合，故亦會有各種不同之 isotype 抗原暴露於外，故兔對此沉澱之免疫抗體必包含所有之 isotype 抗原之抗體。(二) 兔經此沉澱免疫之後，經筆者觀察並未發生任何自體免疫現象，顯然兔之淋巴球可完全分辨出兔本身之抗體和豬 IgG 抗體。因此兔應該對 IgG 分子上之所有抗原產生免疫抗體。由圖 8 亦可知，由沉澱免疫兔所產生之抗體與進口之抗豬 IgG 抗體特異性完全相同。

筆者於使用沉澱免疫家兔時所用之抗原量為每隻兔 4 mg，補強時減半。但以可溶性豬之 IgG 免疫家兔時所用之量為 2 mg，補強時減半。此乃由於筆者假設前者中有一半之量為兔抗體之故。由表 1 可知此沉澱免疫兔所發生之免疫反應較可溶性 IgG 免疫兔之反應為強，是否由於沉澱中所含之抗原 (豬 IgG) 量較高，抑或不溶性抗原之免疫特性較優之故，有待繼續之研究。

由圖 7 可知，吾人以試管沉降物免疫兔後所得之抗體，與進口之抗 IgG 抗體，在對豬血清之免疫電泳分析上除 IgG 外尚發現兩條小線。此可能是 IgM 或 IgA。此可用接有 IgM (圖 9) 之 Sepharose 4 B 之分離柱去除含抗輕鏈之抗體改進^(1,4,5)。

本試驗進行了新的抗原純化試驗，結果得知將此抗體抗原之沉澱物免疫家兔亦可獲得十分實用之抗體，其品質不比進口者差。在材料上，100 ml 之豬血清以傳統生產法可得 733 mg 之 IgG。若以本文所發展之方法則可將血清中所有之 IgG 回收。既節省材料又節省操作步驟。至於從事沉降時所用之特異性抗血清亦不須使用進口商品。只要用自行純化之 IgG 免疫家兔即可自製相當多量之抗血清。此外，未能完成之抗 IgM 及 IgA 抗血清之瓶頸亦可使用此項技術突破解決。

雖然筆者所生產之抗體目前國外已有商品，但筆者認為國內自製此項產品不但可減低售價供應國人從事研究工作，且可節省外匯，無形中可提升國內之研究水準。

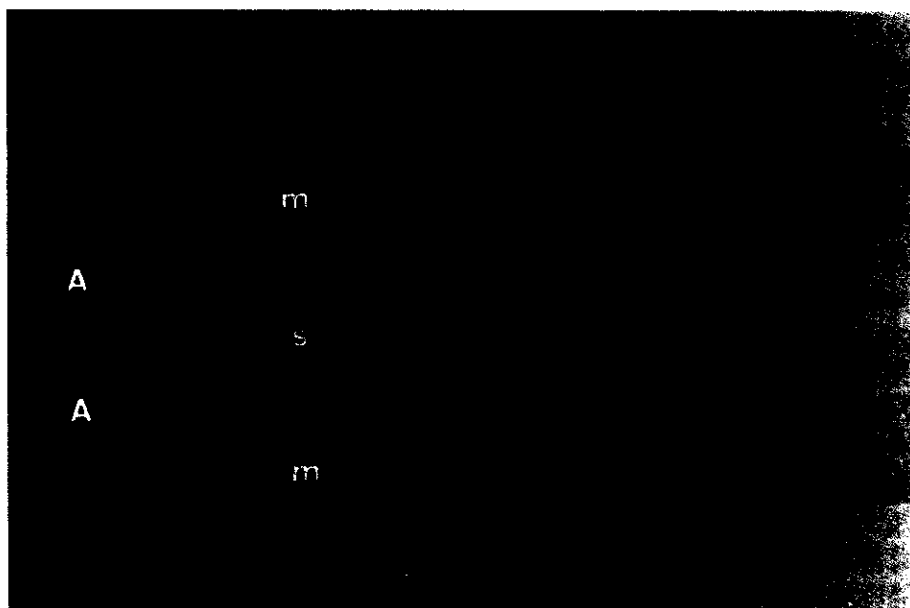


圖9 筆者按輝武⁽³⁾等人之方法所自行純化之IgM (m)•s為豬血清，A為抗豬血清•由沈降線可知IgM尚不純，但不含IgG(由比較圖6)，故可用來去除抗輕鏈抗體。

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. 劉榮標 (1984) 獸醫微生物學，第一版，P. 625 - 642。國立編譯館。
3. 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。
4. Hudson, L., F.C. Hay 1980 Practical Immunology. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications。
5. 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。
6. Roitt, I.M. 1980 Essential Immunology, 4th ed. Blackwell Scientific Publications。
7. 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。

A Simple method for the production of antiserum to swine immunoglobulin G

Andrew C.Y. Fei, T.S. Huang, G.F. Lin, Y.P. Lin, S.H. Tsao

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health.

Rabbit anti-swine IgG antiserum was produced by immunizing rabbits by with the lattice precipitate of commercial specific rabbit anti-swine IgG antiserum and swine whole serum. The produced antiserum was identical with commercial anti-swine IgG antiserum when tested in agar gel precipitation and immunoelectrophoresis against swine whole serum. The water-insoluble lattice precipitate of swine IgG and its antibodies is a good antigenic materials and it is also a simple and rapid method for the production of specific antiserum.

、
、
、
、

、
、
、