家禽誌 26(4) : 247~252(1999) K.J. Poult. Sci. 26(4) : 247~252(1999)

Bovine Serum Albumin 투여가 산란계의 품종별 면역반응에 미치는 영향

채현석 · 김동운 · 안종남 · 김용곤 · 이종문 · 노환국 · 윤병선 · 심정석[1]
농촌진흥청 축산기술연구소

The Levels of Immune Response on Bovine Serum Albumin(BSA) Injection to Different Breeds of Laying Hen

H. S. Chae, D. W. Kim, C. N. Ahn, Y. K. Kim, J. M. Lee, H. G. Nho,
B. S. Youn and J. S. Sim[1]
National Livestock Research Institute, RDA, Suwon 441-350, Korea

ABSTRACT

This experiment was carried out to investigate the effects of the laying hens breeds on the immune response against bovine serum albumin(BSA) in egg yolk. Total 45 laying hens were divided into three groups according to breeds(White Leghorn, ISA Brown, Native hen). They were fed the experimental diet for 12 weeks. Immune response were examind in egg yolk from three groups of hens injected with BSA. The results obtained from this work were summaried as follows: 1. The weight of egg yolk and the percentage of hen-day production in the ISA Brown hens are greater than those in the Native hens and the White Leghons. 2. IgY concentrations in eggs from hens immunized with BSA were not different among the breeds laying hens. 3. The anti-BSA antibody activities determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in the egg yolk were similar between the White Leghorn and ISA Brown hens, but Native hens tended to decrease in 20~50 days respectively.

Therefore, the weight of egg yolk and the percentage of hen-day production in the ISA Brown hens are greater than those in the Native hens and the White Leghons will be as important factors for an efficient production of IgY.

(Key words: bovine serum albumin(BSA), yolk antibody(IgY), immune response, egg yolk)

서 론

산란계는 외부로부터 침입한 특이물질(항원)에 대한 감염으로부터 신속하게 항체를 생산할 뿐 아니라 (Carroll 등, 1983; Shimizu 등, 1988), 자손을 보호하기 위해서도 혈액에 함유된 것보다 더 많은 항체를 계란으로 이전시킨다(Patterson 등, 1962; Rose 등, 1974, Nakai 등 1994).

항원으로 병원성미생물 등을 산란계에 투여하면 면

[1] Canada Alberta University(Department of Animal Science, University of Alberta Edminton, Alberta T6G 2P5, Canada)

역체계에 의하여 특이 면역항체(specific IgG)가 생성된다. 이러한 특이 면역항체(S-IgG)는 질병 예방용으로 사용될 뿐만 아니라, 조제분유나 충치 예방 또는 특정병원성 미생물에 의한 식중독 예방용 식품 개발도 가능할 것으로 알려지고 있다(Bar-Joseph 등, 1980, Shimizu 등, 1988).

그러나 특이 면역항체(S-IgG) 생산 방법은 실험동물을 도태한 후 혈액을 이용하여 제조하기 때문에 생산비가 비싼 단점이 있었지만, 그러나 계란을 이용하면 실험동물을 도태하지 않고도 매일 산란계가 생산한 계란으로부터 특이 면역항체(S-IgY) 생산이 가능하다. 조류들은 오래전 진화를 통해 포유류로부터 분리되어 왔으며 포유류의 단백질에 대해 항체 생산에 적합하도록 되어져 왔다. 계통적인 차이 때문에 그들은 포유류의 항원에 대해 포유류의 항체가 반응하는 것보다 더 많은 부위에 결합 반응한다. 그리고 닭의 항체는 불변부위의 수용체와 결합하지 않기 때문에 효소면역반응법(ELISA)을 이용한 항원, 항체 반응에서 나타나는 보체 활성으로 발생하는 부정적인 간섭현상으로 줄일 수 있다. 이러한 장점 때문에 최근에는 조류 면역체계에 대한 많은 과학 정보가 개발되어 다양한 polyclonal IgY의 분리 기술이 예방의학과 생물학적 진단 도구로 널리 이용되고 있다.

산란계의 면역 생리를 이용한 계란의 특이항체 생산 기술은 가축의 질병예방이나 치료뿐만 아니라 사람에게까지 적용할 수 있어서 앞으로 많은 연구가 될 것이다.

따라서 본 연구에서는 산란계를 이용하여 특이항원(bovine serum albumin; BSA)에 대한 특이항체를 생산하기 위하여 항체 측정방법, 항체에 대한 품종별 면역특성 구명하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 시험기간, 장소 및 공시동물

본 시험은 1998년 4월 21부터 7월 6일까지 11주간에 걸쳐 축산기술연구소 시험 축사에서 실시하였으며, 48주령의 ISA Brown, White Leghorn, 재래닭을 처리당 15수씩 45수를 공시하였다.

2. 사양관리

Table 1. Formulation of experimental diets

Ingredients	Formula
	..... % .....
Yellow corn	64.41
Soybean meal	17.22
Wheat bran	8.95
Limestone	8.02
Tricalcium phosphate	0.73
Vit.-min. mix.[1]	0.39
Salt	0.25
Antibiotics	0.03
Se(mg /kg)	0.6
Zn(mg /kg)	300
Total	100
Chemical composition	
Metabolizable energy(kcal /kg)	2,700
Crude protein (%)	14.5
Calcium (%)	3.25
Available phosphorus(%)	0.25

[1] The vitamin and mineral mixtures provided the following per kg diet : Vitamin A 1,500,000IU; Vitamin D_3 250,000IU; Vitamin E 250IU; Vitamin K_3 250mg; Vitamin B_2 1,000mg; Vitamin B_{12} 1,000mg; Cholinechloride 35,000mg; Niacin 5,000mg; Caphantothenate 1,000mg; Folacin 20mg; B.H.T 6,000mg; Mn 12,000mg; Zn 9,000mg; Fe 4,000mg; Cu 550mg; I 250mg; Ca 7,150mg; UGF 200,000mg.

시험사료는 한국표준가축사료 급여기준(닭, 1994)에 준하여 배합된 사료(Table 1)를 무제한 급여하였고, 공시한 산란계는 2단으로된 산란계용 철재 cage에서 1칸에 1수씩 사육하였다.

시험사료와 물은 자유로이 섭취할 수 있게 하였고 점등시간은 자연 일조시간을 포함한 17시간으로 하였으며 광도는 20Lux로 하였다. 기타 사양관리는 축산기술연구소 관행 방법에 준하여 실시하였다.

3. 조사항목 및 조사방법

1) 산란율 및 난중

산란율은 시험기간 중 생산된 총 산란수를 공시 수수로 나누어 백분율로 표시하였다. 난중은 매일 오후

4시에 집란 후 칭량하여 총 난중을 총 산란수로 나누어 평균 난중으로 계산하였다.

2) BSA를 이용한 산란계 면역화

산란계에 대한 면역과정은 각 처리별로 동일하게 다음과 같이 Sunwoo 등(1996)의 방법을 이용하였다. 즉, 먼저 산란계를 면역시키기 위하여 1mg BSA를 phosphate buffer saline(PBS)로 용해시킨 뒤, 동일한 양의 Freund's complete adjuvant으로 유화시켰다. 혼합된 BSA 1mg을 산란계의 가슴 4부위에 주사하고, 2주 후에 다시 booster injection을 Freund's incomplete adjuvant에 유화하여 재주사하였다. 생성된 항체를 분석하기 위한 계란은 항원을 주사한 후부터 매일 수거하여 4℃ 냉장고에 보관하여 분석용 시료로 사용하였다.

3) 난황 단백질 및 항체(IgY)측정

계란의 난황내 단백질 함량은 BSA를 단백질 표준농도 물질로 이용하여 Lowry 등(1951)의 방법에 의해 측정하였고, 또한 water soluble protein fraction(WSPF) 분획방법(Nakai 등, 1994)을 이용하여 난황으로부터 immunoglobulin(IgY)을 분리하였다. 분획방법은 계란에서 분리한 난황을 차거운 산성용액(pH 2.5)으로 10배 희석하면서 잘 섞어준 후 최종 pH를 5.0으로 조정한다. 4℃에서 6시간 동안 배양 후 12,000g(4℃)로 원심분리 시켰다. 여과 후 상층액을 WSPF 로써 수집하였다.

IgY의 함량 측정은 single radial immunodiffusion(SRID) 방법(Mancini, 1965)으로 다음과 같이 수행했다.

즉, 1.7ml barbital buffer(50 mM sodium babital, 10 mM babital, pH 8.6)와 0.3ml rabbit anti-chicken IgG를 혼합하여 56℃에서 배양을 하고, agarose 70mg는 4.67ml barbital buffer와 0.35% (w/v) sodium azide 0.4 ml를 혼합하여 완전히 녹을 때까지 끓여 56℃에서 배양한 후, 다시 두 용액을 철저히 섞어 준비된 SRID plate에 부어 식힌 후에 SRID plate에서 젤리상태로 굳으면 직경이 0.3mm가 되게 구멍을 뚫어 놓는다.

그리고 SRID plate 구멍에 난황으로부터 분리한 WSPF 용액 3㎕와 chicken IgG standards를 0.05 mg에서부터 0.8mg까지 수준별로 주입하여 3일간 상온에서 배양한다.

배양이 완료되면 SRID plate에 주입한 액이 확산된 흔적의 직경을 측정하여 IgY 함량을 구하였다.

4) Anti-BSA IgY 역가

산란계에 lipopolysaccharide(LPS)를 주사한 후에 채취한 serum과 LPS에 대한 항체는 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)로 다음과 같이 분석하였다.

즉, microtitre plates를 LPS 항원[10㎍/ml in carbonate-bicarbonate buffer(0.05 M, pH 9.6)]으로 코팅한 후 24시간 상온에서 배양하였으며, 배양된 plates를 탈 이온수에 3번 씻은 후 BSA 150㎕ [1% in carbonate-bicarbonate buffer(0.05 M, pH 9.6)]를 각 well에 채운 후 37℃에서 30분 정도 다시 배양하였다.

PBS-tween 20 buffer로 3차례 세척한 후에 PBS-Tw.로 1,000 배 희석한 IgY 용액을 각 plates에 150㎕씩 넣어 37℃에서 1시간 배양한 후 다시 PBS-Tw.로 plates를 3회 세척하였다.

150㎕ rabbit anti-chicken IgG conjugated horseradish peroxidase(1:1000 in PBS-Tw.)를 각 plates의 well에 넣고 37℃에서 1시간 배양하였다.

다시 PBS-Tw.로 plates를 3회 세척한 후에 0.03 % sodium perborate를 함유하고 있는 0.05M phosphate citrate buffer(pH 5.0)를 이용하여 2-2', -Azino-bis(3-ethyl benzthiazoline-6-sulfonic acid)를 녹여 100㎕씩 각 well에 넣고 30 분간 반응시킨 후 405nm에서 ELISA로 측정하였다.

4. 통계분석

본 시험에서 얻어진 결과는 통계처리를 위해서 SAS program(1985)을 이용하여 분석하였고 최소유의차(LSD) 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 산란율 및 난중

Table 2. Laying performance during the experimental period[1]

Items	ISA Brown	Native hen	White Leghorn
Hen-day prodution(%)	81.42 ± 11.9	46.18 ± 19.50	80.90 ± 13.50
Egg weight(g)	65.02 ± 1.79	54.72 ± 2.63	63.34 ± 1.37

[1] Both hen-day prodution and egg weight were derived from the experimental period(72 days).

사양시험의 산란성적은 Table 2에서와 같다. 시험기간중 평균 산란율은 재래계가 46.18%였으며, ISA Brown과 White Leghorn은 각각 81.42% 및 80.90%였다. 이와 같은 결과는 X. Li 등(1998)이 35주령 White Leghorn의 산란율은 85.1%이었다는 보고와 유사한 경향을 나타냈다. 그러나 Road Island Red의 산란율은 46.6%으로 재래계와 비슷한 경향을 나타냈다. 계란의 평균난중은 재래계가 54.72g이었으며, ISA Brown과 White Leghorn은 각각 65.02g과 63.34g이었다.

2. 난황 단백질 및 항체(IgY) 함량

산란계 품종별 난황의 무게는 Table 3에서와 같이 재래계가 17.41g, ISA Brown과 White Leghorn이 각각 18.66과 18.38g이었다.

난황의 단백질 함량은 재래계가 1.93g, ISA Brown과 White Leghorn는 각각 2.14 및 2.25g이었다. 이와 같은 결과는 X. Li 등(1998)이 White Leghorn의 난황 단백질은 2.46g이었다는 결과와 비교시 비슷한 결과를 나타내었다.

난황의 IgY 함량은 재래계가 0.17g이었으며, ISA Brown과 White Leghorn은 각각 0.23g과 0.19g이었다. 이와 같은 결과는 Sunwoo 등(1996)이 White Leghorn에 *S. typhimurium*을 주사한 후 난황 IgY 함량은 10.5mg/g이었다는 결과와 비교하여 볼 때 유사한 결과를 나타내었다.

손 등(1998)은 Hy-Line Brown에 *S. mutans*를 주사한 후 항체 함량을 측정한 결과 11.3mg/g이었다는 결과는 본 연구에서 ISA Brown의 난황 무게가 18.66g임을 감안할 때 난황당 0.21g으로 비슷한 결과를 나타냈다.

이상의 결과는 난황 IgY 함량은 산란계에 주사하는 항원에 따라 쉽게 변화되지 않음을 알 수 있었다.

시험기간(72일간) 동안 산란계 품종별 총 IgY 함량은 재래계가 5.6g인 반면 ISA Brown과 White Leghorn의 총 IgY 함량은 각각 13.5g과 11.1g으로 재래계보다 ISA Brown이나 White Leghorn을 이용하여 IgY를 생산하는 것이 경제성이 더 좋을 것으로 사료된다.

난황 단백질 중에 IgY가 차지하는 비율은 재래계가 8.7%이고 ISA Brown과 White Leghorn은 각각 10.8% 및 8.5%이었는데, 이러한 결과는 Sunwoo 등(1996)이 보고한 9.0%와 비슷한 결과를 나타내었다.

Table 3. Protein and IgY content in yolk produced during the experimetal period

Items	ISA Brown	Native hen	White Leghorn
Yolk weight(g)	18.66 ± 0.84[a]	17.41 ± 0.23[a]	18.38 ± 0.45[a]
Protein in yolk(g)	2.14 ± 0.09[a]	1.93 ± 0.14[a]	2.25 ± 0.05[a]
% Protein in yolk	11.50 ± 0.19[a]	11.09 ± 0.73[a]	12.32 ± 0.54[a]
IgY in yolk(g)	0.23 ± 0.01[a]	0.17 ± 0.01[b]	0.19 ± 0.01[ab]
% IgY in yolk	1.23 ± 0.03[a]	0.96 ± 0.06[b]	1.05 ± 0.08[ab]
Total protein prod.(g)[1]	125.4	64.17	131.1
Total IgY prod.(g)[1]	13.5	5.6	11.1
IgY/protein×100(%)	10.8	8.7	8.5

[ab] Means within a column with no common superscripts are significantly different($P<.05$).

[1] Both total protein and IgY production were derived from the experimental period(72 days).

3. WSPF(Water soluble protein fraction)에 함유된 IgY의 회수율

난황으로부터 IgY를 WSPF(Nakai, 1988) 방법에 의하여 분리하였을 경우 IgY 회수율은 Table 4와 같다.

즉, 재래계 난황에서는 IgY 회수율은 88.89%이고 ISA Brown과 White Leghorn에 있어서 IgY 회수율은 각각 84.09%와 86.04%로 평균 회수율은 86%로 비교적 높은 효율로 난황의 IgY를 회수할 수 있었다.

이와 같은 결과는 Sunwoo 등(1996)이 WSF 방법에 의한 난황 IgY 회수율은 78.2~81.9%였다는 보고와 비슷한 결과를 나타내었다.

4. WSPF(Water soluble protein fraction)내 anti-BSA IgY 역가

산란계에 BSA를 주사한 후 생산된 난황의 anti-BSA IgY의 역가(O.D값)는 Table 5에서와 같다.

즉, 각 품종별 난황으로부터 측정한 anti-BSA IgY 역가의 범위는 BSA를 주사한 후 10일에 0.035~0.087인 반면 40일경에는 0.181~0.443으로 최고치를 나타내다가 이후에는 약간 감소하는 경향을 나타냈다.

이러한 결과는 Shimizu(1988)가 30~50주령인 White Leghorn에 *E. coli* O142:K86:H6의 사균을 주사한 후 계란의 *anti-E. coli* O142:K86:H6의 항체 역가를 ELISA(405nm)를 이용하여 측정한 결과, 면역 주사 후에는 계속 증가하는 경향을 보이다 40일경에 최고치를 나타내다가 차츰 감소되는 경향을 나타내었다는 보고와 비슷한 경향을 보였다.

품종별 anti-BSA IgY의 역가는 BSA를 주사한 후 40일째에 재래계가 0.181이었고 ISA Brown과 White Leghorn이 각각 0.443과 0.291로 ISA Brown이 재래계보다 2.4배 정도 역가가 더 높았다. 위와 같은 결과는 재래계보다는 ISA Brown과 White Leghorn이 어떤 항원에 대한 생체 면역 반응에서 보다 민감하게 작용하여 더 많은 항체를 만들 수 있는 능력을 보유하고 있는 것으로 사료된다.

적 요

본 연구에서는 산란계 품종별로 BSA를 투여하였을 때 면역화된 계란 난황의 anti-BSA IgY 역가 변화와 IgY 함량에 대한 품종별 면역특성을 구명하고자 수행하였다. 산란계의 품종별 난황내 IgY 함량은 재래계가 0.17g인 반면에 ISA Brown이 0.23g으로 높았으며, 면역주사후 72일간 산란율 및 난황 무게를 고려하

Table 4. IgY content in egg yolk and water soluble fraction(WSPF)

Items	ISA Brown	Native hen	White Leghorn
IgY in yolk(mg/ml)	12.19 ± 0.30[a]	9.63 ± 0.55[b]	10.56 ± 0.85[ab]
IgY in WSF(mg/ml)	10.36 ± 0.22[a]	8.32 ± 0.73[b]	9.06 ± 0.63[ab]
Percentage recovered in WSF	85.05[a] ± 0.92	86.19[a] ± 4.48	86.10[a] ± 2.61

[ab] Means within a column with no common superscripts are significantly different(P<.05).

Table 5. Anti-BSA IgY titer in water soluble protein fraction(WSPF) (unite: O.D val.)

Days	ISA Brown	Native hen	White Leghorn
10[1]	0.087 ± 0.03[a]	0.035 ± 0.01[a]	0.058 ± 0.01[a]
20	0.153 ± 0.04[ab]	0.058 ± 0.01[b]	0.188 ± 0.05[a]
30	0.369 ± 0.08[a]	0.078 ± 0.00[b]	0.270 ± 0.06[ab]
40	0.443 ± 0.11[a]	0.181 ± 0.00[b]	0.291 ± 0.04[ab]
50	0.331 ± 0.09[a]	0.109 ± 0.01[a]	0.218 ± 0.04[a]

[ab] Means within a column with no common superscripts are significantly different(P<.05).

[1] Passing days after injecting BSA.

였을 때 총 IgY의 생산량은 ISA Brown이 13.5g으로 재래계의 5.6g 보다 2.4배 정도 높았다.

난황내 anti-BSA IgY의 역가는 BSA를 주입후 40일째의 품종별 anti-BSA IgY의 역가(O.D값)는 재래계가 0.181이고 ISA Brown과 White Leghorn이 각각 0.443 및 0.291으로 ISA Brown이 재래계보다 2.4배 정도 더 높았다.

따라서 계란으로 부터 특이 항체 생산을 위해서는 anti-BSA IgY의 역가나 총 IgY의 생산량을 고려할 때 재래계보다는 ISA Brown과 White Leghorn을 이용하는 것이 더 좋을 것으로 사료된다.

(색인 : 소의 혈액 알부민, 난황항체, 면역반응, 난황)

인용문헌

Bar-Joseph M, Malkinson M 1980 Hen egg yolk as a source of antiviral antibodies in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) : A comparison of two plant viruses. J Virol Methods 1:179-183.

Carroll SB and Stollar BD 1983 Antibodies to calf thymus RNA polymerase Ⅱ from egg yolks of immunized hens. J Biol Chem 258: 24-26.

Li X, Nakano T, Paek BH, Chae HS, Sim JS 1998 Effect of chicken strains, egg production and egg size on IgY production in the laying hens. Poul Sci 77:266-270.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951 Protein Measurement with the folin phenol reagent. 265-275.

Mancini G, Carbonora AO, Heremans TF 1965 Immunochemical quantification of antigen by single radial immunodiffusion. Immunochemistry 2:235-242.

Nakai S, Li-Chan EL, Lo KV 1994 Separation of immunoglobulin from egg yolk. Pages 94-105 in: Egg uses and processing technologies: New development. J S Sim and S Nakai, ed. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.

Nakai S, Shimizu M, Fitzsimmons RC 1988 Anti-E. coli immunogloblin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. J Food Sci 5:1360-1366.

Patterson R, Younger JS, Weigle WO, Dixson FJ 1962 The metabolism of serum proteins in the hen and chick and secretions of serum proteins by the ovary of the hens. J Gen Physiol 45: 501-513.

Rose M, Orlans E, Buttress N 1974 Immunoflobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. Eur J Immunol 4:521-523.

SAS Institute 1985 SAS User's guide statistics. version, 5 Edition, SAS Institute Inc., Cary, NC.

Shimizu M, Fitzsimmons RC, Nakai S 1988 Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. J Food Sci 53:1360 -1366.

Sunwoo HH, Nakano T, Dixon WT, Sim JS 1996 Immune responses in chickens against lipopolysaccharide of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Poul Sci 75:342-345.

농촌진흥청 1994 한국표준가축사료급여기준(닭).

손동화, 노정해, 김영붕, 한찬규, 성기승, 이남형 1998 난황으로부터 항 충치 항체의 분리 및 그 특성. 한국식품과학회지 제 30권 제5호:1029-1034.