免疫去勢用抗原之生產及接種公土雞之免疫反應(1)

蕭振文(2)　劉瑞珍(2)　翁佳君(3)　蔡麗卿(2)　陳立人(2)
黃祥吉(4)　楊惠郎(3)　戴謙(5)(6)

收件日期：94 年 6 月 21 日；接受日期：94 年 9 月 19 日

摘　要

本研究旨在研發免疫去勢抗原並接種公土雞之後評估免疫反應及其對性腺發育之影響。試驗利用大腸桿菌（*Escherichia coli, E. coli*）表現之重組去毒性綠膿桿菌外毒素（recombinant *Pseudomonas* exotoxin, rPE）做為攜帶蛋白（carrier protein），與激性腺素釋放素（gonadotropin-releasing hormone, GnRH）化學連接後做為免疫原（GnRH-rPE），進行公土雞之免疫接種。試驗動物為畜試土雞公雞 40 隻，逢機分為 4 組，分別為正常對照組、磷酸緩衝液（phosphate-buffered saline, PBS）添加佐劑接種組、外科去勢組與 GnRH-rPE 接種組，免疫原之接種採頸部皮下多點注射，於公土雞第 3 週、第 6 週及第 16 週齡接種 3 次抗原。結果顯示，接種 GnRH-rPE 之公雞能誘發抗 -PE 與抗 -GnRH 的抗體，然而公雞之外觀、雞冠發育、生精作用及睪丸重等均與正常之對照組與 PBS 接種組公雞無差異。由此結果顯示接種 GnRH-rPE 可誘發抗體產生，而力價卻未能有效拮抗 GnRH 功能而抑制公雞之性腺發育與生精作用。

關鍵詞：免疫去勢、激性腺素釋放素、疫苗、綠膿桿菌外毒素。

緒　言

綠膿桿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）是一種感染皮膚受創動物的病菌，其生產的外毒素（*Pseudomonas* exotoxin, PE），結構可分為 3 個區域，分別為轉位作用區（translocation domain）、細胞辨識區（recognition domain）與腺苷二磷酸－核糖轉移酶（ADP-ribosyl transferase）區（Hwang

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1293 號。
(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。
(3) 國立成功大學生物科技研究所。
(4) 行政院農業委員會畜產試驗所產業組。
(5) 國科會南部科學園區管理局。
(6) 通訊作者，E-mail: taichain@stsipa.gov.tw。

et al., 1987）。PE 毒素在疫苗生產的應用上是極佳的生物佐劑（bioadjuvent），做為重組基因疫苗也能有效保護小鼠，免於高劑量 PE 之攻毒致死（Shiau *et al*., 2001）。

性釋素（release hormone）是下視丘所製造，釋入血管後循環至各器官調控各種激素之分泌，是生理激素調控之樞紐。大部份的性釋素是由 10 個胺基酸所組成的簡單肽（peptide）。激性腺素釋放素（gonadotropin-releasing hormone，GnRH）是調控哺乳動物性腺發育之主要內泌素，屬於高度保留的小分子蛋白，哺乳動物的GnRH胺基酸組成為pGlu-His-Try-Ser-Gly-Leu-Arg-Pro-NH_2-Gly（Arimura *et al*., 1973; Ladd *et al*., 1988）。家禽的GnRH，有第一型Glu-His-Trp-Ser-Gly- Gly-Leu-Glu-Pro-Gly-與第二型Glu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly兩種（Sharp *et al*., 1989; Miyamoto *et al*., 1984）。GnRH 在內分泌的調控可以誘發排卵素（luteinizing hormone, LH）及激濾泡素（follicle stimulating hormone, FSH）之釋放而控制繁殖功能。LH 及 FSH 是控制動物生育的二種主要性激素（Braden *et al*., 1989; Schally *et al*., 1973）。在雄性動物，LH 調控性腺、輔性腺之發育，並刺激睪丸中睪固酮的合成與生精作用； FSH 為誘發並維持生精作用所必需（Xue *et al*., 1994）。在雌性動物，FSH 促進卵巢濾泡的生長，增加動情素之分泌，LH 則促使成熟濾泡之排卵。

利用免疫接種的方式，產生抗體而抑制 GnRH 的功能，將降低血中 LH 及 FSH 的濃度，使雌性動物之排卵與雄性動物之生精作用中止、延遲性腺發育並減少內泌素分泌，達到類似外科去勢的效果（Thompson, 2000）。由於GnRH為小分子自體抗原，本身非良好免疫原，無法被免疫系統辨識，其胺基酸序列亦缺少可與大分子蛋白的接合（conjugate）位置（Ferro and Stimson, 1999）。為了進行化學接合，將其特定胺基酸序列修飾，則 GnRH 可與其他蛋白質接合。修飾後的 GnRH 可接上牛血清蛋白（bovine serum albumin, BSA）、卵白蛋白（ovalbumin）、匙孔笠貝血藍蛋白（keyhole limpet haemocyanin，KLH）或破傷風毒素（*tetanus* toxin）等大分子而作為疫苗（Ladd *et al*., 1988; Talwar, 1989），用以接種動物後誘發產生中和 GnRH 的抗體。在實驗動物如小鼠、大鼠（Ladd *et al*., 1989; Ladd, 1993）、兔子（Arimura *et al*., 1973）、大動物如牛（Adams and Adams, 1992; Adams *et al*., 1993）、公羊（Schanbacher, 1982）、豬（Meloen *et al*., 1994）、猴子（Ladd, 1993）、狗與貓（Ladd *et al*., 1994），接種抗原後均迅速誘發抗體而中和 GnRH 的作用，抑制動物之生殖作用，做為調控動物生育的疫苗使用（Thompson, 2000）。免疫去勢疫苗的研發，具有使用簡單、可大量處理且合乎動物福利等優點。

近年來，國人對於高品質雞肉之需求日益殷切，傳統的閹雞因肉質鮮嫩可口而廣受消費者青睞，市場售價較一般雞肉高而具較高之經濟價值。近年來，養雞業者為求區隔市場以提高競爭力，閹雞的飼養有逐年增加之趨勢。傳統閹雞的生產需要外科去勢的特殊技術，公雞於 8-10 週齡時進行外科去勢，手術需要費用，且術後部分雞隻會因緊迫或感染而損失。因此，若能研發免疫去勢疫苗，只需接種即可達到類似外科手術去勢的目的，將有其潛在的應用價值。因此本試驗利用去毒性之rPE與GnRH 化學接合後做為免疫去勢疫苗並接種公土雞，探討 rPE-GnRH 接種對土雞性腺發育之影響。

材料與方法

I. 免疫原之製造與純化

試驗使用 *E. coli* 菌株（HB101）做為宿主，應用 BL21（DE3）菌株進行 rPE 的表現。rPE 的生產是將表現 rPE 基因的載體 pJH4（Hwang *et al*., 1987）插入 T7 啟動子的表現載體中，表現之 rPE 已預先刪除野生型 PE 第 533 至 613 個胺基酸之基因序列而去除毒性。表現載體在 *lac* 啟動子的調控下經 IPTG（isopropylthio- β -D-galactoside）誘發 T7 RNA 聚合酶的作用而合成 rPE。為了大量生

產 rPE，將帶有 pJH4 的 BL21（DE3）經 37℃隔夜培養，俟菌液吸光值達到 OD_{650} = 0.3 時添加 IPTG 至最後濃度為 1 mM 並持續培養 2 h。由於生產的 rPE 是以內涵體（inclusion body）型式存在菌體內，故進一步利用蛋白質重折疊套組（refolding kit）（Novagen, Madison, WI, USA）處理使 rPE 回復自然構型供試驗之用。

II. 免疫原之化學接合

為了使 GnRH 產生抗體，應用大分子蛋白或毒蛋白與特定胺基酸經過修飾的 GnRH 進行化學接合是可行的方法（Thompson, 2000）。利用 rPE 做為攜帶蛋白，與第 6 個胺基酸序列已經過修飾成為離胺酸的 GnRH（D-Lys^6-GnRH）（Sigma, St. Louis, MO, USA），利用 amine-carboxylic 化學接合套組（Pierce Chemical, Rockfold, IL, USA）進行化學接合。

III. SDS-PAGE 與西氏轉漬分析

生產之GnRH-rPE抗原經過13%聚丙醯胺膠體電泳（SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）分析，條件為 100 volt 30 min，之後將膠體浸入染劑（0.1% Commassie Blue R-250，50% Methanol 與 10% Acetic acid）中染色 40 min。再以脫色液（40% Methanol 與 10% Acetic acid）脫色 3-4 h 後，檢視蛋白質電泳結果。

西氏轉漬分析之進行，乃應用轉漬器（Hoefer TE 70 SemiPhor, Amersham Pharmacia）將膠體上之蛋白質轉漬至 PVDF 膜（Roche, Germany）後，將轉漬膜置入含 5% 牛血清白蛋白（bovine serum albumin, BSA）之 blocking 溶液 1 h，再利用含有 2% BSA 之磷酸緩衝液（PBS/Tween-20, PBS/T）清洗 3 次後，將轉漬膜置入含 1,000 倍稀釋的一級抗體（rabbit anti-GnRH）之 PBS 溶液中於 4℃ 下隔夜反應。轉漬膜以 PBS/T 清洗 3 次後，置入經稀釋 5,000 倍的二級抗體（Alkaline phosphatase goat anti-rabbit IgG）之 PBS 中於 37℃下反應 1 h。轉漬膜以 PBS/T 清洗 3 次後，置入含有受質 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphatase（BCIP）/ Nitro-blue tetrazolium（NBT）（Sigma, USA）之緩衝液進行呈色反應。

IV. 試驗動物與免疫注射計畫

孵化之畜試土雞 12 號公雞 40 隻，飼養至 3 週齡時逢機分為 4 組（每組 10 隻），分別為：

（i） 外科去勢組：公土雞於 8 週時進行外科去勢手術。

（ii） 正常對照組：未接受外科手術去勢並未注射任何抗原或佐劑者。

（iii）PBS 加佐劑接種組：公雞於第 3、6 及 16 週齡時注射 0.3 ml PBS/CFA（Complete Freund's Adjuvant, CFA）（Difco, Detroit, MI）、PBS/IFA（Incomplete Freund's Adjuvant, IFA）（Difco, Detroit, MI）佐劑。

（iv）GnRH-rPE 接種組：公雞於第 3、6 及 16 週齡時注射 0.3 mg 的 GnRH-rPE/CFA 或 GnRH-rPE/IFA。抗原與佐劑充分混合至乳化狀態再行注射。接種採頸部皮下多點注射，第一次接種之佐劑為 CFA，補強接種之佐劑為 IFA。免疫原注射後每隔 2 週採集血樣，離心收集血清，置於 -20℃供進行酵素免疫分析（ELISA）檢測抗體力價。

試驗動物除採集血清樣品外，並分別在第 16 及 24 週齡犧牲一半動物，採集公雞睪丸進行稱重及組織學分析。

V. 血清抗體力價分析

（i） ELISA 分析微滴盤之製備：使用 96 孔之 ELISA 微滴盤，將抗原（PE 或 KLH-GnRH）溶於 coating 緩衝液中（0.013 M Na_2CO_3, 0.035 M $NaHCO_3$, pH 9.6）並調整抗原至最後濃度

5 μ g/ml，每孔加入 100 μ l，於 4℃下隔夜靜置後倒去抗原，以 PBS/T（0.14 M NaCl, 1.5 mM KH_2PO_4, 2.6 mM KCl, 0.02% Tween-20, pH 7.4）清洗 2 次，再加入 blocking 溶液（含 5% 脫脂乳之 PBS/T）100 μ l，於 4℃下隔夜靜置後移除並以 PBS/T 清洗 2 次，此即為製備完成之 ELISA 分析微滴盤，可直接供分析或置於 -20℃備用。

（ii）ELISA 分析：血清樣品經過適當稀釋後，每孔加入 100 μ l 樣品，於室溫下靜置 2 h，而後以 PBS/T 清洗 4 次，再加入 100 μ l 經 3000 倍稀釋之二級抗體 alkaline phosphate conjugate，於 4℃下靜置 2 h，再以 PBS/T 清洗 4 次，最後加入溶於 10% diethanolamine 的 p-nitrophenyl phosphate（Sigma, USA），於 37℃顯色 30 min，並以 ELISA reader（Thermo Labsystem, Finland）在波長 405 nm 下測量吸光值。

VI. 血液中睪固酮濃度分析

血清樣品取得後，利用睪固酮分析套組（Testosterone ELISA kit, Neogene, USA）並依其步驟分析雞隻血清樣品中之睪固酮濃度。

VII. 組織學分析

試驗結束後將公土雞犧牲，摘取睪丸秤重後進行組織學分析。睪丸取出後以 Bouin's 溶液固定 6 h，再保存於 70% 酒精中。組織樣品經石臘包埋並切成 5 μ m 厚度之樣品以供進行 H&E 染色與顯微鏡檢之用。

VIII. 雞冠面積之測量

公土雞於第 16 與 24 週齡時測定雞冠長度（雞冠的最前端點至最末端點）與高度（雞冠的最高點至最基部點），計算雞冠面積（cm^2）。

IX. 統計分析

測定之睪丸重、血清睪固酮濃度與雞冠面積資料，應用統計分析系統（statistical analysis system, SAS）之套裝軟體進行 ANOVA 分析以測定差異顯著性。

結果與討論

本試驗利用去毒性 rPE 做為攜帶蛋白，與 GnRH 化學連接後做為抗原，接種公土雞並探討免疫反應及其對性腺發育之影響。生產抗原所需要之 rPE 經由表現載體轉染 *E. coli* 後大量生產純化，與 GnRH 化學接合後進行西氏轉漬以確認 rPE 與 GnRH 連接物之特異性。結果發現抗原可分別與抗 -GnRH 或抗 -rPE 抗體產生特異性雜合反應（圖 1）。顯示生產的抗原可供動物接種之用。

本試驗在公土雞第 3 週齡時進行第一次抗原接種，而後於第 6 週及第 18 週齡時補強注射。結果發現接種 rPE-GnRH 抗原之公土雞在補強注射後誘發抗 -GnRH 與抗 -PE 的抗體，抗體力價維持約 4 週後開始下降（圖2）。而正常對照組與PBS注射組則完全無抗-GnRH與抗-PE的抗體反應（圖2）。

試驗之公土雞分別於第 16 與 24 週時犧牲一半動物，採集睪丸稱重並進行組織學分析。結果正常對照組、PBS 注射組與 GnRH-rPE 注射組在第 16 週齡時之睪丸重（Means ± SD）分別為 16.7 ± 2.58 g、12.3 ± 2.78 g與16.5 ± 3.0 g，第24週齡時睪丸重分別為26.4 ± 3.47 g、25.3 ± 3.0 g與29.2 ±3.6 g。GnRH-rPE注射組公雞與正常對照組及PBS注射組間公土雞之睪丸重量並無差異（表1）。

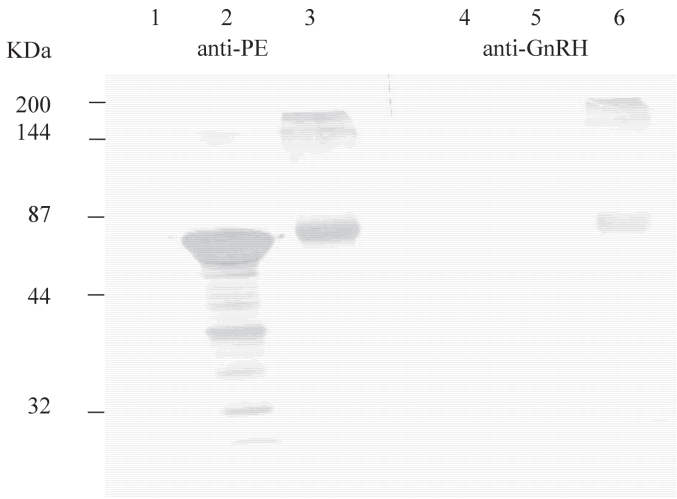

圖 1. 利用西氏轉漬確認 rPE 與 GnRH 化學連接物。1-3 行與 3-6 行分別利用抗 - PE 與抗 - GnRH 抗體測試。

Fig. 1. Identification of the rPE and GnRH-rPE conjugate by Western blot analysis with antibody against to PE（lane 1-3）and GnRH（lane 4-6）, respectively. Lane 1 and 4 were negative controls. Lane 2 and 5 were rPE proteins. Lane 3 and 6 were GnRH-rPE conjugates.

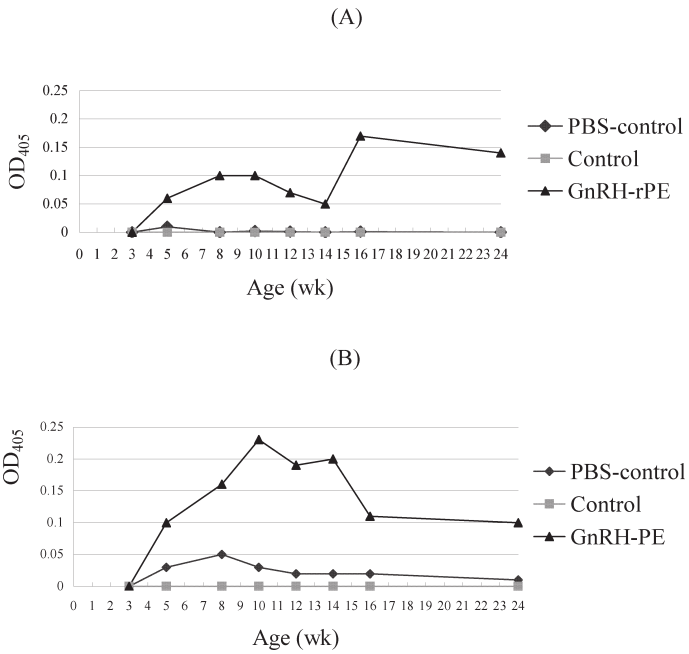

圖 2. 雞隻血清中抗 -GnRH 與抗 -PE 之抗體力價分析。

Fig. 2. Antibody titer analysis of chicken immunized with of GnRH-rPE.（A）Anti-GnRH antibody titer.（B）Anti- PE antibody titer.

雞隻在第 16 週齡與第 24 週齡的睪固酮濃度，外科去勢組與其他三組差異顯著（P ＜ 0.05）（表 2）。而睪丸進行組織切片的結果顯示，GnRH-rPE 注射組與正常對照組或 PBS 注射組間的公雞均可觀察到正常發育的生精細管，管腔中存在著各階段的精細胞及成熟精子（資料未顯示）。顯示接種免疫去勢疫苗的公土雞雖然可以產生抗 -GnRH 之抗體，卻未產生抑制公土雞睪丸之生長、發育及生精作用之效果。而各組的公土雞除了外科去勢組之外，均有正常發育之雞冠（P ＜ 0.05）（表 2）。外科去勢組、正常對照組、PBS 注射組與 GnRH-rPE 注射組在第 16 週齡時之雞冠面積分別為 8.2 ± 1.2、43.0 ± 7.7、43.9 ± 5.0 與 36.3 ± 10.4 cm^2，第 24 週齡時雞冠面積分別為 10.5 ± 2.1、83.1 ± 7.0、91.6 ± 4.6 與 70.2 ± 1.8 cm^2。GnRH-rPE 注射組公雞與正常對照組及 PBS 注射組間公土雞之雞冠面積並無差異，但與外科去勢組比較呈現顯著差異（P ＜ 0.05）。

表 1. 各組雞隻在第 16 與 24 週齡時睪丸重與體重分析

Table 1. Analysis of testis and body weights in different groups of chickens at 16 and 24 weeks of age

Weeks of age	Group	N	Testis weight (g)	Body weight (g)
16	Normal control	5	16.7 ± 2.58	1478.9 ± 65.75
	PBS control	5	12.3 ± 3.5	1522.3 ± 37.95
	GnRH-rPE	5	16.5 ± 5.0	1443.5 ± 58.50
24	Normal control	5	26.4 ± 3.5	1913.4 ± 49.17
	PBS control	5	25.3 ± 3.0	2043.3 ± 55.12
	GnRH-rPE	5	29.2 ± 3.6	1870.2 ± 47.56

表 2. 各組雞隻在第 16 與 24 週齡時之睪固酮濃度與雞冠面積分析

Table 2. Analysis of testosterone concentrations and comb area of chickens in different groups at 16 and 24 weeks of age

Weeks of age	Group	N	Testosterone conc. (ng/ml)	Comb area (cm^2)
16	Normal control	10	1.42 ± 0.51^a	43.0 ± 7.7^a
	PBS control	10	1.23 ± 0.90^a	43.9 ± 5.0^a
	GnRH-rPE	10	1.61 ± 1.29^a	36.3 ± 10.4^a
	Castration	10	0.21 ± 0.09^b	8.2 ± 1.2^b
24	Normal control	5	1.52 ± 1.21^a	83.1 ± 7.0^a
	PBS control	5	1.72 ± 1.27^a	91.6 ± 4.6^a
	GnRH-rPE	5	1.54 ± 2.11^a	70.2 ± 3.6^a
	Castration	5	0.30 ± 0.21^b	10.5 ± 2.1^b

[a, b] Means±SD in the same column with different letters were significantly different (P＜0.05)

在生產抗原或疫苗時，使用攜帶蛋白的主要目的在增強特異性的免疫反應，促使接種動物引發高度的T細胞或B細胞反應，使抗原發揮作用而達到疫苗接種之目的（Ferro and Stimson, 1998; Ferro *et al*., 2002）。由於 GnRH 原本即存在動物體且組成簡單，在動物體中不易產生免疫反應。若 GnRH 與攜帶蛋白連接，可增加抗原之分子量，促進抗原表現細胞吸收抗原，延長抗原作用的半衰期（Ferro *et al*. 1996; Ferro *et al*., 2002）。傳統疫苗生產常用的攜帶蛋白，有卵白蛋白、牛血清白蛋白、甲狀腺球蛋白與馬血清白蛋白等，均可與 GnRH 進行化學接合（Ladd *et al*., 1988; Talwar, 1989）。

利用重組DNA的方法，以細菌作為生產疫苗的工具，例如細菌的纖毛能重複呈現外源抗原的抗原決定基（epitope），而提供做為生產特異抗原之用。*E. coli*之表面P-纖毛基因內含五個高變異區，利用重組DNA 技術將帶有GnRH密碼的核酸序列插入P- 纖毛基因內，可以高效率的表現融合蛋白，經過純化後接種雌性大白鼠與雄性仔公牛，誘發強烈的抗 -GnRH 抗體而抑制動物之性腺發育與生殖功能（van der Zee *et al*., 1995; Sosa *et al*., 1998）。其次，細菌生產的毒素若能降低毒性而誘發強烈的抗原性而不致毒害細胞，亦可做為攜帶蛋白而供疫苗研發之用。應用重組 DNA的方法修飾細菌之毒素蛋白，去除或降低毒性，再接入不同套數的 GnRH 基因密碼，經選殖入表現載體，再轉型 *E. coli* 大量生產重組蛋白供製造免疫去勢疫苗（Oonk *et al*., 1998; Zhang *et al*., 1999）。生產的免疫去勢疫苗，與GnRH 接合的細菌毒素有破傷風類毒素（*tetanus* toxoids, TT）、白喉毒素（*Diphtheria* toxoid, DT）（Ladd *et al*., 1989）與去毒性綠膿桿菌外毒素（*Pseudomonas* exotoxin, PE）（Pai and Pastan, 1998）。rPE- GnRH接種公豬後，使動物之性腺與輔性腺明顯萎縮，同時在睪丸的組織切片中發現生精作用完全中止，並未觀察到成熟精子存在，達到如外科去勢的效果（蕭等，1997）。為了發展適用的抗原，生產之重組型蛋白必需測試其有效性，而構築基因插入攜帶蛋白的位置與基因套數等因素亦需試驗而擇取最佳條件。

PE 雖是強的細菌毒素，卻是促進免疫反應的極佳生物佐劑。Pai *et al*.（1998）以基因重組法，將 PE 的區域 Ia 刪除，成為分子量 40 kDa 的 PE40 蛋白，或再移除部分區域 Ib 而成為分子量 38 kDa 的 PE38 蛋白，此兩種重組型 PE 之毒性均較原始型 PE 降低至少 200 倍，作為免疫毒素蛋白並應用在疫苗開發之研究。本試驗應用區域 III 部份刪除的rPE與GnRH化學接合，分子量大於PE40或PE38蛋白，經化學接合後產製的抗原接近自然構型，唯缺點在於化學接合反應乃逢機進行，抗原之接合效率不易評估（Ferro and Stimson, 1998）。

哺乳動物應用免疫去勢法以抑制生殖作用的研究甚多。Ladd *et al*.（1994）曾利用 LHRH 與破傷風類毒素接合，混合 MDP A-5（N-acetyl-nor-muramyl-L-alanyl- D-isoglutamine）佐劑後，接種公狗與公貓，比較不同的抗原注射量及去勢效果的持續時間。結果公狗在疫苗補強注射後其血清中睪固酮即下降至如同外科去勢公狗的濃度並維持至 19 週。睪丸大小較疫苗接種前萎縮了 30%。經過 3 個月，注射疫苗的公狗因抗 -GnRH 抗體力價降低使性腺逐漸恢復正常。此時再進行疫苗補強接種，公狗之抗-GnRH抗體隨即上升而再度抑制生殖作用。至於注射去勢疫苗的公貓，僅 50% 產生抗體，卻未見睪固酮濃度降低而與正常公貓無異（Ladd *et al*., 1994）。本研究結果顯示，接種 GnRH-rPE 之公雞能誘發抗 -PE 與抗 -GnRH 的抗體，然而公雞之外觀、生精作用及睪丸重等均與正常之對照組與 PBS 接種組的公雞無異，睪丸的組織學分析亦可見到成熟精子，顯示接種 GnRH-rPE 可誘發抗體產生，但力價卻不足以有效拮抗 GnRH 的功能而抑制公雞之性腺發育。此結果與公貓注射免疫去勢疫苗後未產生足夠之抗 -GnRH 抗體並使血中睪固酮濃度降低，無法有效抑制公貓之性腺發育結果相似的（Ladd *et al*., 1994）。因此，動物種別之差異、使用之佐劑、抗原的注射劑量與時間、抗原之生產方式等重要因素，將產生不同的去勢結果。由於目前尚未見應用免疫去勢法進行家禽接種的相關研究報告，因此上述可能的原因將是進一步試驗及改善免疫去勢疫苗效力的研究方向。

參考文獻

蕭振文、戴謙、宋永義、楊惠郎。1997。以免疫方法進行公豬之免疫去勢。中畜會誌 26（增刊）：86。

Adams, T. E. and B. M. Adams. 1992. Feedlot performance of steers and bulls actively immunized against gonadotropin-releasing hormone. J. Anim. Sci. 70 ： 1691-1698.

Adams, T. E., C. A. Daley, B. M. Adams and H. Sakurai. 1993. Testis function and feedlot performance of bulls actively immunized against gonadotropin-releasing hormone : effect of implants containing progesterone and estradiol benzoate. J. Anim. Sci. 71 ： 811-817.

Arimura, A., H. Sato, T. Kumasaka, R. B. Worobee, L. Debeljuk, J. Dunn and A.V. Schally. 1973. Production of antiserum to LH-releasing hormone（LHRH）associated with gonadal atrophy in rabbits: Development of radioimmunoassay for LHRH. Endocrinology 93 ： 1092-1103.

Braden, T. D., B. E. Hawes and P. M. Conn. 1989. Synthesis of GnRH receptors by gonadotrope cell cultures. Endocrinology 125 ： 1623-1629.

Ferro, V. A. and W. H. Stimson. 1998. Investigation into suitable carrier molecules for use in an anti-gonadotrophin releasing hormone vaccine. Vaccine 16：1095-1102.

Ferro, V. A. and W. H. Stimson. 1999. Anti-gonadotropin releasing hormone vaccines and their potential use in the treatment of hormone-responsive cancers. Bio. Drugs 12 ： 1-12.

Ferro, V. A., M. A. Khan, E. R. Earl, M. J. Harvey, A. Colston and W. H. Stimson. 2002. Influence of carrier protein conjugation site and terminal modification of a GnRH-I peptide sequence in the development of a highly specific anti-fertility vaccine. Part I. Am. J. Reprod. Immunol. 48 ： 361-371.

Garzan, F., D. L. Thompson, D. D. French, J. J. Wiest, R. L. St George, K. B. Ashley, L. S. Jones, P. S. Mitchell and D. R. McNeill. 1986. Active immunization of intact mares against gonadotropin releasing hormone and follicle stimulating hormone. Biol. Reprod. 35 ： 347-352.

Hwang, J., D. J. Fitzgerald, S. Adhya and I. Pastan. 1987. Functional domains of *Pseudomonas* exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in *E. coli*. Cell 48 ： 129-136.

Ladd, A., P. Gopinath, Y. Y. Tsong, Y. Probst, W. Chung and R. B. Thau. 1988. Active immunonization against GnRH combined with androgen supplementation is a promising antifertility vaccine for males. Am. J. Reprod. Immunol. Microbiol. 17 ： 121-127.

Ladd, A., Y. Y. Tsong, G. Prabhu and R. B. Thau. 1989. Effects of longterm immunization against LHRH and androgen treatment on gonadal function. J. Reprod. Immunol. 15 ： 85-101.

Ladd, A. 1993. Progress in the development of anti-LHRH vaccine. Am. J. Reprod. Immunol. 29 ： 189-194.

Ladd, A., Y. Y. Tsong, A. M. Walfield and R. Thau. 1994. Development of an antifertility vaccine for pets based on active immunization against luteinzing hormone releasing hormone. Biol. Reprod. 51 ： 1076-1083.

Meloen, R. H., J. A. Turkstra, H. Lankhof, W. C. Puijk, W. M. M. Schaaper, G. Dijkstra, C. J. G. Winsing and R. B. Oonk. 1994. Efficient immunocastration of male piglets by immunoneutralization of GnRH using a new GnRH-like peptide. Vaccine 12 ： 741-746.

Miyamoto, K., Y. Hasegawa, M. Nomura, M. Igarashi, K. Kangawa and H. Matsuo. 1984. Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin

secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81 ： 3874-3878.

Oonk, H. B., J. A. Urkstra, W. M. M. Schaaper, J. H. F. Erkens, M. H. S. D. Weerd, A V. Nes, J. H. M. Verheijden and R. H. Meloen. 1998. New GnRH-like peptide construct to optimize efficient immunocastration of male pig by immunoneutralization of GnRH. Vaccine 16 ： 1074-1082.

Pai, L. H. and I. Pastan. 1998. Clinical trials with *Pseudomonas* exotoxin immunotoxins. Cur. Topics Microbiol. Immunol. 234 ： 83-96.

Schally, A. V., A. J. Kastin, A. Arimura, D. Coy, E. Coy, L. Debeljuk and T. W. Redding. 1973. Basic and clinical studies with luteinizing hormone-releasing hormone（LH-RH）and its analogues. J. Reprod. Fertil.（Suppl.）20 ： 119-136.

Schanbacher, B. D. 1982. Responses of ram lambs to active immunization against testosterone and luteinizing hormone-releasing hormone. Am. J. Physiol. 242 ： E201-205.

Sharp, P. J., R. T. Talbot, G. M. Main, I. C. Dunn, H. M. Fraser and N. S. Huskisson. 1989. Physiological roles of chicken LHRH-I and －II in the control of gonadotrophin release in the domestic chicken. J. Endocrinol. 124 ： 291-299.

Shiau, J. W., T. K. Tang, Y. L. Shih, C. Tai, Y. Y. Sung, J. L. Huang and H. L. Yang. 2001. Mice immunized with DNA encoding a modified *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A develop protective immunity against exotoxin challenge. Vaccine 19：1106-1112.

Sosa, J. M., Y. Zhang, D. M. deAvila, K. P. Bertrand and J. J. Reeves. 1998. Immunization of heifers against a recombinant ovalbumin-LHRH. J. Anim. Sci. 76 ： 214（abstract）.

Talwar, G. P. 1989. Vaccine and passive immunological approaches for the control of fertility and hormone-dependent cancers. Immunol. Reviews 171 ： 173-192.

Thompson, D. L. 2000. Immunization against GnRH in male species（comparative aspects）. Anim. Reprod. Sci. 60-61 ： 459-469.

van der Zee, A., C. V. Noordegraaf, H. van den Bosch, J. Gielen, H. Bergmans, W. Hoekstra and I. Van Die. 1995. P-fimbriaee of Escherichia coli as carriers for gonadotropin releasing hormone development of a recombinant of a recombinant contraceptive vaccine. Vaccine 13：753-758.

Xue, J. L., G. D. Dial, S. Bartsh, B. Kerkaert, E. J. Squires, W. E. Marsh and G. Ferre. 1994. Influence of a gonadotropin-releasing hormone agonist on circulating concentrations of luteinizing hormone and testosterone and tissue concentrations of compounds associated with boar taint. J. Anim. Sci. 72 ： 1290-1298.

Zhang, Y., T. G. Rozell, D. M. deAvila, K. P. Bertrand and J. J. Reeves. 1999. Development of recombinant ovalbumin-luteinizing hormone releasing hormone as a potential sterilization vaccine. Vaccine 17： 2185-2191.

Production of immunocastration antigen and the immune response of Taiwan native roosters after vaccination (1)

Jen-Wen Shiau (2), Jui-Jane Liu Tai (2), Jia-Jun Weng (3), Lee-Ching Tsai (2), Lih-Ren Chen (2), Hsiang-Chi Huang (4), Huey-LangYang (3) and Chein Tai (5)(6)

Received ： June 21, 2005 ； Accepted ： Sept. 19, 2005

Abstract

The purpose of this study was to develop an immunocastration antigen and to use it as vaccine to immunizing Taiwan native roosters. Gonadotropin-releasing hormone（GnRH）is a self-antigen and a small molecule that usually cannot elicit an immune response. To generate antibodies against GnRH, it is necessary to link GnRH to immuno-carriers. PE was produced by an opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. A truncated recombinant detoxicated PE（rPE）modified by gene deletion was used as an immuno-carrier which was conjugated chemically with GnRH. This GnRH-rPE conjugate was used to vaccinate roosters of native chickens. Forty roosters were randomly divided into four groups. They were castration, normal control, PBS control and GnRH-rPE vaccination groups, respectively. The roosters received immunization injections at 3, 6 and 16 weeks of age. Results showed that the roosters immunized with the GnRH-rPE were able to generate anti-GnRH and anti-PE antibodies. The GnRH-rPE vaccination roosters showed normal growth and development of reproductive organs. In conclusion, GnRH-rPE vaccination could induce antibody production of native roosters but the immune response against GnRH was not strong enough to inhibit the development of male reproductive organs.

Key words ： Immunocastration, GnRH, Vaccine, *Pseudomonas* exotoxin.

---

(1) Contribution No.1293 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.
(2) Physiology Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.
(3) Institute of Biotechnology, National Cheng-Kung University, Tainan 701, Taiwan
(4) Animal Industry Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.
(5) Southern Taiwan Science Park Administration, National Science Council, Sinshih, Tainan 741, Taiwan, R.O.C.
(6) Corresponding author, E-mail: taichein@stsipa.gov.tw