

우유 내 번식 호르몬의 온라인 측정⁺

On-line Measurement of Progesterone in Bovine Milk

조한근*

정회원

H. K. Cho

1. 서론

젖소 농가에서 생산성을 높이려면 젖소의 번식성능을 최상으로 유지해야 한다. 성공적인 번식관리는 효율적이고 정확한 발정 감지 기술에 크게 의존한다. 발정감지에 실패하게 되면 공태기간이 길어져 유량은 물론 송아지 생산이 감소된다. 발정감지 실패로 인한 공태기간이 한 주기일 경우, 국내 연간 손실이 85억원(2400원/두/일 x 562,000 두 x 30% x 21일)에 이를 것으로 추정된다(Senger, 1994). 공태기간이 지나치게 길어진 저 능력소는 대개의 경우 도태시켜야 하므로 이에 따른 추가손실이 발생되며, 인공수정 횟수 증가에 따른 손실과 수의사 비용 등의 추가 비용은 전체 손실의 10%에 해당된다 (Ruiz et al., 1992, Britt, 1985).

현재 국내 대부분의 낙농가들은 육안으로 발정을 감지하고 있는데, 정확한 진단을 위해서는 많은 숙련이 필요하며, 대개의 경우 정확도가 낮은 편이다. 저렴한 도구인 꼬리 표시기 또는 Kamar mouting 감지기 등을 이용하여 mounting 횟수를 기록하는 방법이 있지만 정확도는 50%에 불과하다. 다른 방법으로 만보계가 사용되기도 하는데, 시간이 많이 걸리고 농장 사용에 불편한 점이 많다. 국내에서는 임상 수의사의 직장검사에 의한 난소상태와 임신의 감정, 혈장, 유즙 progesterone 농도측정 (강 등, 1995), 초음파 진단, 및 임신진단 키트 등이 사용되고 있지만, 사용범위가 실험실로 제한되거나 연속적인 측정에 어려움이 많아 발정의 정확한 감지에는 도움이 되지 않는다. 과학적이며 정확한 방법으로서 번식 호르몬인 프로제스테론의 농도를 직접 측정하는 방법이 고려된다. 보편적으로 많이 사용되는 방법으로 방사성 면역기법(Radio immunoassays, RIA)과 효소 면역 흡착법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)이 있는데, 이 방법들로 정확한 결과는 얻을 수 있으나 검사 비용이 비싸며 실험실에서만 작업이 가능하여 발정지속 시간에 비해 시료이송을 포함한 처리 시간이 많이 소요되고, 특히 RIA의 경우 폐기물 처리의 문제가 수반된다. 키트를 사용하는 경우 실험실적인 방법에 비해서는 간편한 편이지만, 일반 농가에서 사용하기는 쉽지 않고 연속적인 측정을 위해서는 전문인력이 고정 배치되어야 하며, 대개의 경우 양성이나 음성 결과를 얻게되어 정확한 측정이 불가능할 뿐만 아니라 개체관리에도 적합하지 않다.

+ 본 연구는 농업과학 공동기기 센터 (NICEM) 지원에 의해 수행되었음.

* 충북대학교 농과대학 농업기계공학과

바이오 센서는 생물학적 감지요소와 신호변환기를 접속한 장치로 정의되는데, 검사 대상인 측정될 화학물질이 생물인식 분자(receptor)와 반응하여 신호가 전달된다(Blum and Coult, 1991). 바이오 센서는 선택적이어서 관심 물질의 고감도 측정이 가능하다(Claycomb and Delwiche, 1996). 우유 내의 progesterone을 연속적으로 측정할 수 있는 바이오 센서가 개발되면, 착유장치에 부착되어 연속적인 측정이 가능해 가축의 효율적 개체 관리가 가능해진다. 우유의 프로제스테론을 측정하기 위해 항체를 10MHz 수정표면에 부착한 생화학적인 센서가 개발되었는데, 수정의 노출시간이 길어지는 문제로 실시간 측정이 불가능하였고, 농도의 정량 측정 대신에 고저 측정만 가능하였다(Koelsch, 1994). 그후 EIA 기법을 이용한 프로제스테론의 실시간 측정용 모형 바이오센서가 개발되었는데, 실시간 측정이 가능한 시간 단축형 EIA가 개발되었다고 보고 되었다(Claycomb and Delwiche, 1996). 국내에서는 키트가 생산되어 일부 사용되고 있지만, 번식호르몬 측정을 위한 바이오 센서 개발과 관련된 연구는 보고된 바 없다.

본 연구에서는 우유 내의 번식 호르몬인 프로제스테론 측정을 위한 온라인 바이오 센서 개발에 선행되는 연구로서 프로제스테론의 양을 착유기간 중에 측정할 수 있는 온라인 기술을 개발하기 위하여 콜로이드 금을 이용한 면역색층 분석법이 중점 연구되었고, 면역반응에 의한 착색정도를 측정하기 위한 신호처리 연구가 수반되었다.

2. 재료 및 방법

가. 재료

프로제스테론 홀몬에 대한 단클론 항체, 프로제스테론과 BSA(Bovine serum albumin) 복합물 (위치3 연결) 및 프로제스테론은 Biostrid 사(미국)에서, Nitorcellulose Membrane (12 μm pore size)은 Sleicher & Schull 사(미국)에서, 콜로이드 금 입자 (40 nm)는 BBC international 사(영국)에서 각각 구입하였다. 기타 Bovine serum albumin 및 버퍼용 재료는 Sigma chemical 사(미국)에서 구입하였다.

나. 콜로이드 금을 이용한 면역색층 분석법

경쟁적인 면역 색층분석법(immunochromatography)의 일종으로서 콜로이드 금 입자로 라벨된 프로제스테론과 프로제스테론이 함유된 시료를 단클론 항체 처리가 된 측정 지역을 포함하는 다공성 멤브레인에 떨어뜨리면 모세관 현상에 의해 한쪽 끝으로 이동한다. 이때 시료에 포함된 프로제스테론의 농도가 낮으면 라벨이 항체와 많이 반응하여 진한 붉은 색 반응이 나타나고, 시료의 프로제스테론의 농도가 높으면 라벨이 항체와 적게 반응하여 옅은 붉은 색 반응이 나타나며, 색의 강도는 시료에 포함된 프로제스테론 농도에 반비례한다. 그림 1은 경쟁적인 면역 색층분석기법의 원리를 개략적으로 보여준

다. 이 방법의 특징은 반응시간이 짧으며, 호르몬 측정의 복잡성을 단순하게 해주는 특징을 갖고 있어서 바이오 센서의 기술로 활용 가능하다. 본 연구에서는 Laitinen과 Vuento(1996)이 개발한 방법에 기초하였고, 다음은 중요 내용에 관한 요약이다.

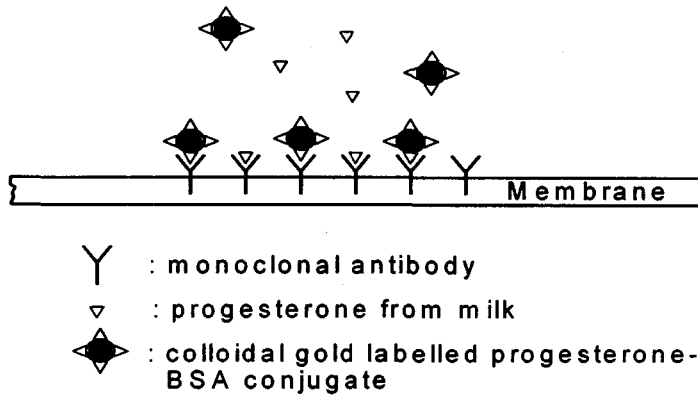


Figure 1. The principle of the competitive thin-layer immunochromatography

1) Immunostrip 준비

항체 용액 1 $\mu\text{l}/\text{cm}$ 을 Nitrocellulose 멤브레인에 한쪽 끝에서 1 cm 위치에 1 mm 두께로 프린트한 후, 실내에서 건조시켜 차단용액(blocking solution, 3% BSA, 5% Sucrose)에 5분 정도 담근 후에 트리스 버퍼액(Tris Buffer Solution pH 8.5)으로 세척한다. 사용하기 전 immunostrip은 4 mm x 50 mm 크기가 되도록 절단하여 냉장 보관한다.

2) 프로세스테론-Bovine serum albumine에 콜로이드 금 입자의 코팅

프로세스테론은 분자량이 작아서 콜로이드 금 입자에 바로 코팅이 안되므로, 프로세스테론과 BSA의 복합물을 구입하여 코팅하였다. 10 ml의 콜로이드 금과 1 ml의 프로세스테론 복합물을 준비하여, 프로세스테론 복합물을 빠르게 휘저으면서 콜로이드 금을 빠르게 추가한다. 실온에서 5분을 기다린 후 110 μl 의 10% BSA (w/v)를 추가하여 안정시킨다. 코팅된 라벨 복합물을 10000g의 속도로 20분 정도 4 °C에서 원심분리 시킨다. 시험관은 고속 원심분리기에 견디는 Corex 사 제품(15 ml)을 사용하였다. 매회 원심분

리 후 상층액을 제거하고, 10 mM Tris 버퍼(0.1% BSA와 0.9% NaCl 함유) 1 ml를 가한 후 다시 원심분리를 반복하였다. 분리 및 세척을 5회 반복하여 최후에 1 ml의 코팅 혼합물을 만들어 사용할 때까지 4 °C 냉장 보관하였다. 세척시 시험관 벽에 붙은 고형 침전물을 부수기 위하여 초음파 분쇄기(Micro Tip 형 Sonicator)를 최저 강도에서 짧은 시간(2초 미만) 사용하였다.

다. 계장 및 자동화

그림 2는 온라인 측정을 위한 바이오 센서의 개략도를 보여준다. 면역 반응으로 Membrane 상에 나타난 색띠에 LED로 일정량의 광을 투과하여 반대편에 있는 Photo diode로 통과된 광량을 측정하여 신호전압으로 변환한다. 측정된 신호를 증폭과 노이즈 제거 후 제어용 PC에 설치된 자료 처리보드로 입력한다. 입력된 아날로그 신호는 디지털신호를 바꾼 후에 내장된 프로그램에 의해 보정작업을 거쳐 progesterone 량으로 모터터에 표시된다. 한편 LED, 펌프 및 밸브는 프로그램에 의해 생성된 출력신호로 달링턴 증폭기를 이용하여 구동된다.

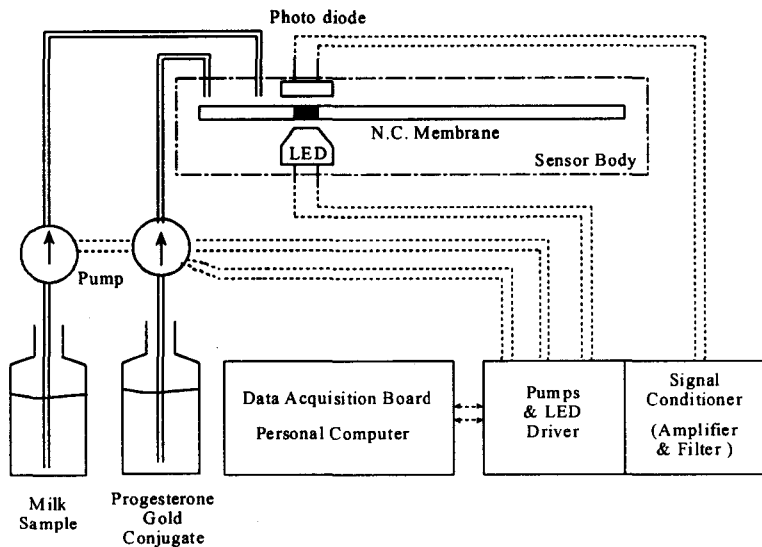


Figure 2 Schematic of an on-line biosensor for progesterone measurement

본 연구에서는 바이오 센서 개발에 활용 가능한 분석법 확립에 주 목표를 두었기 때문에 신호측정 작업만 자동으로 수행하였고, 화학 시료 투여는 수동으로 진행되었다.

3. 결과 및 고찰

전술된 방법에서와 같이, 반응 멤브레인의 측정부에 처리된 단 항체의 질량과 식별용 복합물에 포함된 프로세스테론의 질량 비는 1:5이다. 이 비율은 여러 기초실험을 거쳐서 확인된 최적 값이다. 이 시스템으로 측정할 수 있는 프로세스테론의 양은 우유 10 μl 당 50 ng 임을 확인하였다. 그러나 발정을 감지(1 ng/ml 이하)하기에는 충분하지 않아 측정감도 개선을 위한 지속적인 연구가 필요한 것으로 확인되었다. 그림 3은 Membrane의 색 변화를 광 센서로 측정하여 신호증폭 과정을 거친 출력전압과 시료 내에 포함된 프로세스테론 농도 값의 보정곡선을 보여준다. 그림 3에 표시된 값들은 5개의 평균값과 표준편차를 표시하였고, 농도값을 상용대수로 치환하여 선형 회귀식을 구했을 때의 결정계수 값, r^2 는 0.97로 나타났다. 그림 4는 실험실에서 많이 사용되는 효소면역기법(Enzyme Immuno Assay)으로 측정할 결과 값과의 상관관계를 나타낸 그림이다. 이와 같은 결과는 측정감도를 제외하고는 Laitinen과 Vuento(1996)의 결과와 비슷한 경향을 보여주고 있다. 측정감도와 함께 중요하게 고려할 사항으로서 이 기법의 프로세스테론에 대한 특이성에 대한 연구가 필요하다.

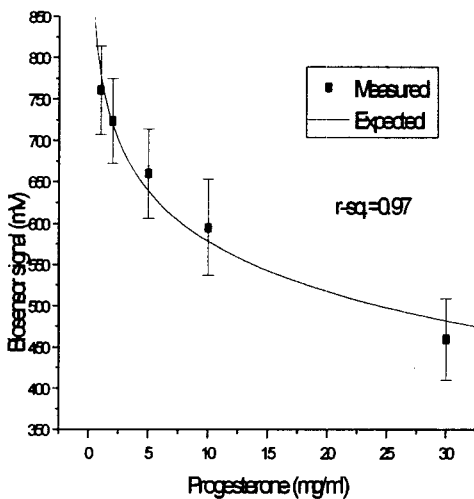


Figure 3 Biosensor calibration curve

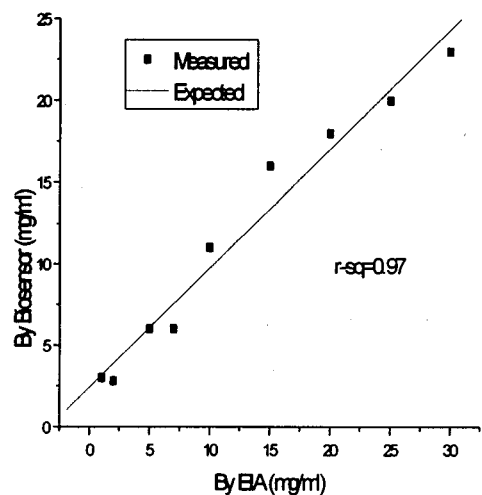


Figure 4 Comparison with EIA method

4. 요약 및 결론

젖소 농가의 생산성을 높이려면 발정의 정확한 진단이 필수적이다. 젖소의 발정은 12 시간 정도 밖에 지속이 안되므로, 실 시간대의 빠른 진단 방법이 필요하다. 번식 호르몬과 같이 분자량이 작은 물질을 측정하려면 면역기법이 효과적이다. 그러나 실험실 방법으로는 시간이 많이 걸리는 단점이 있어서, 실시간 측정이 가능한 바이오 센서의 개발이 시급하다.

본 연구에서는 콜로이드 금을 식별자로 사용하고, 멤브레인을 이용하여 빠른 시간 내에 측정이 가능한 면역 색층분석법을 활용하여, 실 시간 측정기술의 개발을 시도하였다. 실험 결과 발정을 감지하는데 충분한 바이오 센서용 분석방법을 확립하지 못하였지만, 지속적인 연구를 통해 측정감도의 개선이 가능할 것으로 판단된다.

5. 참고문헌

1. 강병규, 최한선, 손장효. 1995. Progesterone 농도측정에 의한 유우의 번식효율증진에 관한 연구 V. 혈장 progesterone 농도측정에 의한 무발정의 감별진단 및 PGF2 α 또는 GnRH 치료효과관정. 대한수의학회지 35(3): 603-613.
2. Blum, L. J. and P. R. Coulet. 1991. Biosensor Principles and Applications. Marcel Dekker, Inc. New York.
3. Britt, J. 1985. Enhanced reproduction and its economic consequences. J. Dairy Sci., 58:1585.
4. Claycomb, R. W., M. J. Delwiche, R. H. BonDurant and C. J. Munro. 1996. Enzyme immunoassay for on-line sensing of milk progesterone. Transaction of the ASAE. 39(2):729-734.
5. Koelsch, R. K., D. J. Aneshansley and W. R. Butler. 1994. Milk Progesterone Sensor for Application with Dairy Cattle. J. Agric. Engr. Res. 58:115-120.
6. Laitinen, M. P. and M. Vuento. 1996. Immunochromatographic Assay for Quantitation of Milk Progesterone. Acta Chemica Scandinavica. 50:141-145.
7. Ruiz, F. J., P. A. Oltenacu and R. D. Smith. 1992. Cost-benefit evaluation of on-farm milk progesterone testing to monitor return to cyclicity and to classify ovarian cysts. J. Dairy Sci., 75(4):1036-1043.
8. Senger, P. L. 1994. The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities. Journal of Dairy Science. 77 (9):2745-2753.