

# T<sub>3</sub>-BSA, T<sub>4</sub>-BSA 접합체 제조 및 생성항체의 방사면역측정적 이용 연구

한국원자력연구소

오 옥 두 · 김 재 록

= Abstract =

## Studies on the Preparation of T<sub>3</sub>-BSA, T<sub>4</sub>-BSA Conjugates, and Radioimmunoassay Use of the Produced Antisera

Ok-Doo Awh, and Jae-Rok Kim

Korea Atomic Energy Research Institute

T<sub>3</sub>-BSA and T<sub>4</sub>-BSA conjugates were prepared and identified spectrophotometrically. The  $\lambda_{max}$  of the conjugates was just coincided with that of BSA, but the molar extinction coefficients of the conjugates were generally larger than that of BSA itself. The molar ratios of T<sub>3</sub>: BSA and T<sub>4</sub>: BSA in the prepared conjugates were found to be 9 : 1 and 5 : 1, respectively. The titers of the T<sub>3</sub> antisera were generally higher (max.  $1.5 \times 10^4$  : 1) than those of T<sub>4</sub> (max.  $2 \times 10^3$  : 1), and the average cross reactivity of the T<sub>3</sub> antibody with T<sub>4</sub> was lower (0.45%) than that of T<sub>4</sub> antibody with T<sub>3</sub> (3~4%).

The results of the study indicate that the predominant cause of the lower titers and the lower specificity of the T<sub>4</sub> antisera comparing with those of T<sub>3</sub> is mainly due to the unstability of the T<sub>4</sub>-BSA and consequent degradation of the conjugate to T<sub>3</sub>-BSA during preparation, purification, and even during immunization. The lower molar ratio of T<sub>4</sub> to BSA in the preparation stage is also considered to be a minor factor.

By measuring T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> levels in the reference control serum, it has been confirmed that the prepared antisera can sufficiently be utilized, respectively, in the established radioimmunoassay systems.

### I. 서 론

3, 5, 3'-triiodo-L-thyronine (T<sub>3</sub>) 및 3, 5, 3'5'-tetraiodo-L-thyronine (T<sub>4</sub>)의 항체를 얻기 위해서는 thyroglobulin을 직접 면역하는 방법<sup>1,2)</sup> 이외에 이들 호르몬을 bovine serum albumin (BSA), human serum albumin (HSA) 등 거대 단백질분자와 접합시켜 접합체 (conjugate)를 만든 다음 이들을 면역하는 방법<sup>3~7)</sup>이 알려져 있다. 분자량이 작은 T<sub>3</sub>나 T<sub>4</sub> 자체로는 거의 im-

munogenic 하지 못한 관계로 거대 단백질과 접합시켜 분자량을 증가시킴으로써 immunogenicity를 부여하도록 하여 항체를 얻는 것인데 이때 얻어진 항체는 T<sub>3</sub>나 T<sub>4</sub>에 특이적일 뿐만 아니라 BSA에 대한 특이성도 있게 되는데 BSA와 특이적으로 결합토록 조건을 만들어 주지 않는 한 그 특이성은 나타나지 않게 된다.

갑상선 호르몬의 방사면역 측정방법은 근래에 와서 T<sub>3</sub> resin uptake나 T<sub>4</sub>의 competitive protein binding assay (CPBA, TBG에 대한 경쟁적 단백질 결합 측정)로부터 조작이 간편하며 측정신뢰도가 높은 T<sub>3</sub>

방사면역측정 (radioimmunoassay, RIA) 및  $T_4$  RIA 로의 번침이 이루어져감에 따라 양질의  $T_3$ ,  $T_4$  항체를 얻는 것은 극히 중요한 문제로 부각되었다.

$T_3$ 나  $T_4$ 를 HSA 와 접합시킨 접합체가 BSA 와 접합 시킨것보다 항체생산효과가 더 좋다는 보고와 함께  $T_4$ -BSA 접합체는  $T_3$ -BSA 접합체보다 더 잘 생성되지만 생성  $T_4$  항체가 (抗體價)는  $T_3$  항체가 보다 낮다고도 한다<sup>4,8)</sup>. 그러나 그와 같은 현상은 확실하지 않으며 그 원인도 확실히 밝혀지지 않았다.

생성항체의 특이성이나 항체가는 접합체의 제조방법 과 순도에 영향을 받는 것인바  $T_4$ 의 경우는 물에 대한 용해도가 비교적 작기 때문에 BSA 와의 접합반응을 순조롭게 하기 위해서는 기보된 방법의 개량을 통한 효과적 접합체 제조방법과 그 생성 확인방법을 검토, 확립하는 것이 매우 중요하다고 생각된다. 본 연구에서는  $T_4$ 의 접합체 제조방법을 개량, 확립하는 한편  $T_4$ 의 항체가가 일반적으로  $T_3$ 의 항체가보다 낮은 이유를 밝히고저 시도하였다. 생성항체의 항체가와 특이성을 검정하고 이를 사용하여  $T_3$  및  $T_4$  RIA 확립 가능성도 검토하였는바 그 결과를 보고하는 바이다.

## II. 실험

### 1) 재 료

- 1) 소혈청 알부민 (bovine serum albumin, BSA); 분별부분 V, 96~99%, Sigma
- 2) Morpho CDI (즉 1-cyclohexyl-3-(2-morpholino-4-ethylcarbodiimide metho-p-toluenesulfonate), 95%, Aldrich
- 3) EDC (즉 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, Sigma
- 4) 3,5,3'-triiodo-L-thyronine ( $T_3$ ), CP, Sigma
- 5) 3,5,3',5'-tetraiodo-L-thyronine ( $T_4$ ), CP, Sigma
- 6)  $T_3$ -<sup>125</sup>I,  $T_4$ -<sup>125</sup>I; 기보된 방법<sup>9)</sup>으로 표지한 것, 비방사능  $T_3$ : 150~200 uCi/ug,  $T_4$ : 30,000~60,000 uCi/ug (단 RIA 때에는 20~40 uCi/ug)
- 7) DMSO, DMF 등: 1급 시약. E. Merck
- 8) 투석막: Spectrapor, Spectrum Med Inc.
- 9) 희석용 완충용액: 0.02 M 페르날 완충용액 pH 8.6, Na<sub>2</sub>S, BSA 등 각 0.1%씩 함유된 것.
- 10)  $T_3$ ,  $T_4$  제거혈청 ( $T_3$ ,  $T_4$  free serum); 혈청 100 ml 에 활성탄소분말 (Norit A, Charcoal, Sigma)

20 g 을 가하여 지으면서 4°C 로 18 hr 유지한 다음 원심분리하여  $T_3$  및  $T_4$  를 흡착 제거한 것<sup>10)</sup>, 흡착의 완전여부를 확인하기 위하여 탄소분말침가에 앞서서  $T_3$ -<sup>125</sup>I, 또는  $T_4$ -<sup>125</sup>I 를 1×10<sup>4</sup> cpm/ml 되게 첨가하고 원심분리후 상등액 방사능을 측정하여 자연방사능 준위와 거의 같음 (대략 99% 제거)을 확인한 것.

- 11) ANS 용액: 8-아닐리노-1-나프탈렌설폰산 (8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid) 암모니움염<sup>3,4,11~13)</sup>; (Sigma) 37.5 mg 을 희석용 완충용액 25 ml 에 녹인 것.
- 12) 맥스트란 탄소분말 현탁액: 맥스트란 (T-80) 0.073 g, 탄소분말 (RIA 급 Schwarz/Mann) 0.73 g 을 100 ml 의 희석용 완충용액에 현탁시킨 것.
- 13)  $T_3$  표준용액 ( $T_3$ , 4,000pg/ml 용액);  $T_3$  Na 염 20.676 mg 을 0.05 M NaOH 10 ml 에 녹인 후 재증류수로 500 ml 되게 희석하고 여기서 1 ml 를 취하여 재증류수로 100 ml 가 되게 하였다. 이 용액 1 ml 를 취하여  $T_3$  free serum 용액으로 100 ml 가 되도록 희석하였다. 1 ml 씩 분취해서 냉동건조하고 4°C 로 보관하였다가 필요에 따라 재증류수로 1 ml 되게 용해하여 사용하였다
- 14)  $T_4$  표준용액 ( $T_4$ , 200 mg/ml 용액)  $T_4$  Na 염의 5 수화물 11.44 mg 을 0.05 M NaOH 10 ml 에 녹여 재증류수로 500 ml 가 되게 하였다. 여기서 1 ml 를 취해내어  $T_4$  free serum 으로 100 ml 가 되게 하였으며 1 ml 씩 분취해 각각 냉동 건조하여 보관하였다가 필요시 reconstitute 하여 사용하였다.

### 2) $T_3$ -BSA, $T_4$ -BSA 접합체 제조 및 분석

기보된 방법<sup>9)</sup>에 따라 40 mg 의  $T_3$  를 0.1 N NaOH 2 ml 에 녹여 작은 삼각플라스크에 담고 여기에다 20 mg 의 BSA 를 3 ml 의 물에 녹여 가하였다. 자석교반기로 지으면서 200 mg 의 EDC 또는 Morpho CDI 를 천천히 가하고 5°C 로 교반하면서 24 시간 동안 유지하고 나서 투석막에 넣고 0.05 M NaOH 로 96 시간 투석한 다음 접합체생성여부를 UV 분광분석법으로 확인하였다 (Table 1).

한편 Gharib 의 방법<sup>12)</sup>에 따라 50 mg 의 BSA 를 재증류수 25 ml 에 녹여 여과한 다음 여액에 30 mg 의 Morpho CDI 를 가하였다. 20 mg 의  $T_3$  (acid form) 를 5 ml 의 DMF 에 녹인 액을 한 방울씩 지으면서 가

**Table 1. Preparation of T<sub>3</sub>-BSA and T<sub>4</sub>-BSA Conjugates**

Protein mg (mole)	T <sub>3</sub> or T <sub>4</sub> chem. form & amount mg (mole)	Molar ratio BSA:T <sub>3</sub> or 3 BSA:T <sub>4</sub>	Coup- ling agent mg	Compo- sition of the medium and pH	Reaction time hrs.	Conjugates*	
						molar ratio BSA:T <sub>3</sub> or 5 BSA:T <sub>4</sub>	T <sub>3</sub> or T <sub>4</sub> bound to BSA %
BSA 20 (3×10 <sup>-7</sup> )	T <sub>4</sub> . Na 44 (5×10 <sup>-5</sup> )	1 : 17	EDC 200	H <sub>2</sub> O 5 & trace NaOH pH 9	24	—	—
"	"	"	Morpho CDI 200	"	"	—	—
BSA 50 (6×10 <sup>-7</sup> )	T <sub>3</sub> . H 10 (3×10 <sup>-5</sup> )	1 : 48	Morpho CDI 40	H <sub>2</sub> O 25 & DMF 5, pH 5.5	18	1 : 9	19
"	T <sub>4</sub> . H 24 (3.7×10 <sup>-5</sup> )	1 : 56	"	"	"	—	—
BSA 50 (6×10 <sup>-7</sup> )	T <sub>4</sub> . Na 15 (1.7×10 <sup>-5</sup> )	1 : 28	Morpho CDI 40	H <sub>2</sub> O 25 & DMF 10 & trace HCl pH 5.5	18	1 : 5	18
"	T <sub>4</sub> ethyl ester 25 (3.7×10 <sup>-5</sup> )	1 : 48	"	"	"	1 : 3	6

\*average of duplicate runs

해 주었다. pH는 묽은 HCl 용액 또는 NaOH 용액으로 대략 5.5로 맞추고 10분후에 다시 10 mg의 Morpho CDI를 더 가해주었다.

실온하에서 18시간 교반하며 반응시키고 앞서와 같은 방법으로 투석하고 분석하였다.

한편 30 mg의 T<sub>4</sub>를 무수 에탄올 300 ml와 진한 황산 한 방울을 섞은 용액에 가하여 환류함으로써 T<sub>4</sub>의 ethylester를 얻고 [그 ethylester나 T<sub>4</sub>(acid form) 20 mg을 DMSO 5 ml에 녹인 다음 이 용액을 BSA 용액 (50 mg의 BSA를 1 ml의 물에 녹이고 여기에다 DMSO 20 ml를 가한 액)에 가하였다<sup>14)</sup>.

여기에 Morpho CDI 용액 (40 mg의 Morpho CDI를 물 1 ml에 녹이고 4 ml의 DMSO를 가한 액)을 방울 방울 가하였다.

pH를 5.5로 맞춘 다음부터는 앞의 기보된 방법과 같이 처리하였다. T<sub>4</sub>(acid form)의 경우 용해도가 낮으므로 15 mg의 T<sub>4</sub>(acid form)을 10 ml의 DMF에 녹여 (T<sub>3</sub>(acid form) 때는 20 mg을 5 ml의 DMF에 녹여 반응시킴). H.Gharib의 방법<sup>15)</sup>에 따라 반응시

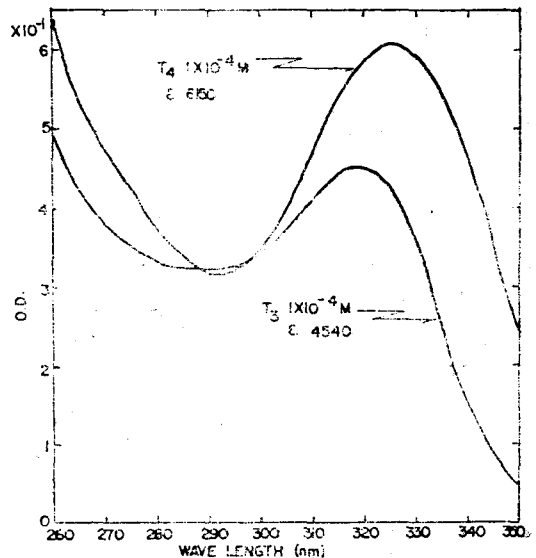


Fig. 1. U.V. spectra of T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub>.

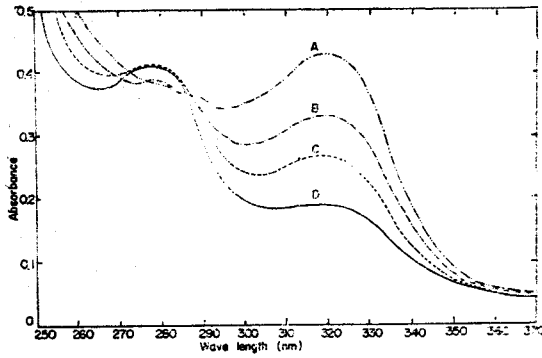


Fig. 2. U.V. spectra of mixtures of BSA and  $T_3$ . (Molar ratio of BSA :  $T_3$  = A; 1 : 90, B; 1 : 20, C; 1 : 10, D; 2 : 10)

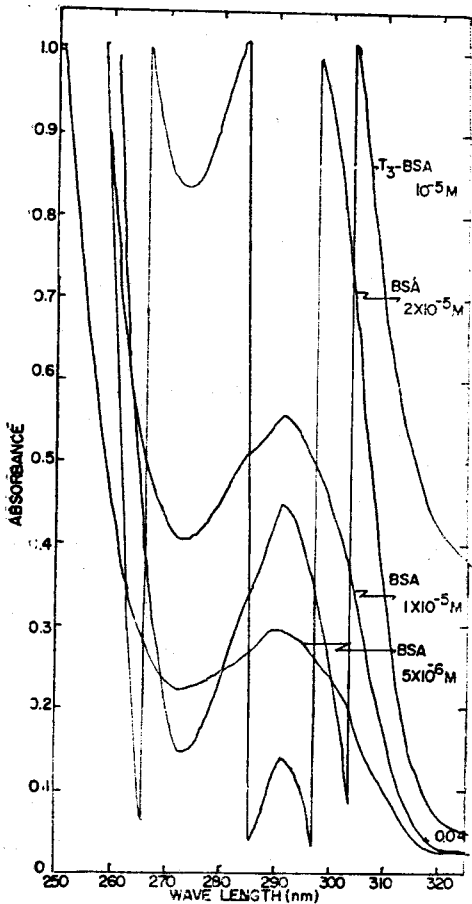


Fig. 3. Comparison of U.V. spectra of BSA and  $T_3$ -BSA conjugates

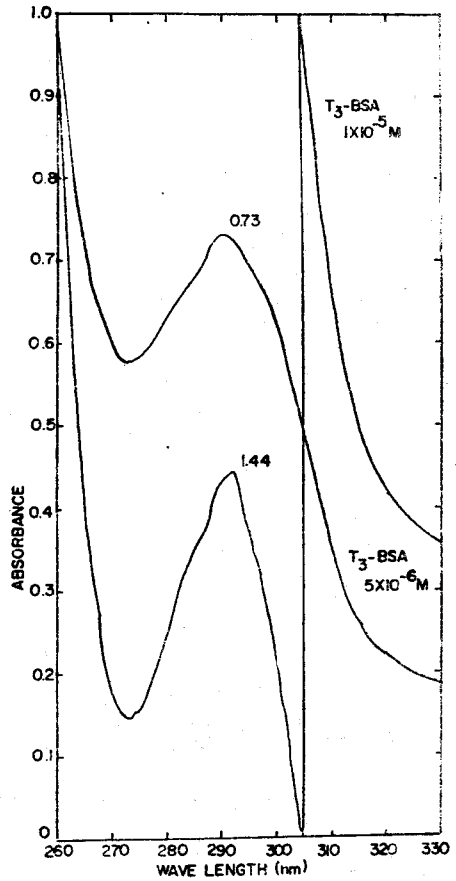


Fig. 4. U.V. spectra of  $T_3$ -BSA of different concentrations

켰다.

생성물의 분광분석을 위하여는 0.05 M NaOH를 용매로 하여 BSA,  $T_4$ -BSA,  $T_3$ -BSA 등은  $1 \times 10^{-5} M$ ,  $T_3$ ,  $T_4$  등은  $1 \times 10^{-4} M$ 의 농도로 최대 흡수파장 ( $\lambda_{max}$ )을 구하고 분자흡광계수도 산출하였으며 (Fig. 1) 흡스펙트럼이 합텐접합체 특유의 것인가를 보기 위하여  $T_4$ 와 BSA와의 혼합비율이 다른 여러 혼합액에 대한 스펙트럼도 조사하였다 (Fig. 2).

BSA 한 분자에 대한 접합  $T_3$ , 또는 접합  $T_4$ 의 mole 수는 합텐접합체가 되었더라도  $T_3$  또는  $T_4$  부분의 분자흡광계수가 원래의  $T_3$  또는  $T_4$ 의 그것과 거의 같다는 가정하에 optical density data로부터 계산하여 구하였다 (Fig. 3, 4, 5).

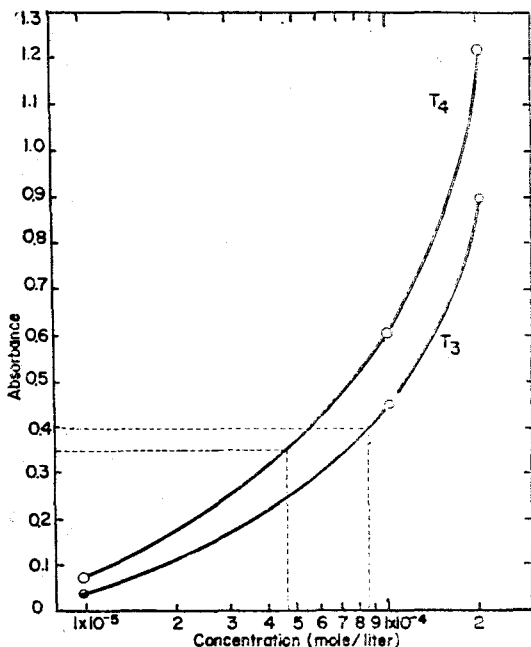


Fig. 5. Standard U.V. absorption curves of T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub>

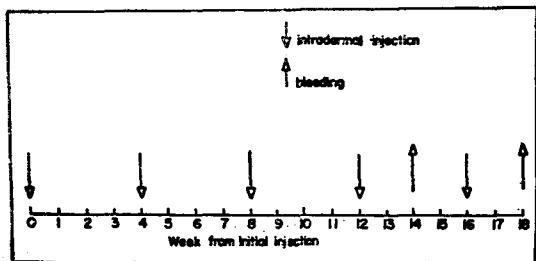


Fig. 6. Immunization schedule

### 3) 면역실험

T<sub>3</sub>-BSA 또는 T<sub>4</sub>-BSA 접합체 약 1mg을 0.85% NaCl 용액 0.5 ml에 녹이고 Freund's complete adjuvant 0.5 ml를 가해 잘 섞어 점성있는 유탁액으로 만든 다음 그 0.5 ml를 목 뒤 양어깨 사이(皮下)에 주사하였다<sup>5,6,12)</sup>. 같은 양을 4주간격으로 4~5회 피하주사하고 최종주사 2주후에 채혈해 혈청을 분리하였다. 0.85% NaCl 용액으로 2배로 희석해 무균 여과하고 -20°C로 냉동 보관하였다(Fig. 7).

### 4) 항체가(抗體價) 측정 및 교차반응성 측정

Table 2와 같은 정온유지 혼합액을 만들고 4°C로 24시간 정온유지한 후에 DCC 현탁액 0.5 ml를 가해 흔들어서 탄소층에 흡착된 방사능을 측정하던가 20% polyethylene glycol(분자량 약 6,000) 수용액 1 ml를 가하여<sup>15,16)</sup> 단백질을 침전, 원심분리하여 침전층 방사능을 측정하여 각각 전체방사능(T)과 관련시킴으로써 미결합 방사성추적자 방사능(F), 항체와 결합한 방사성추적자 방사능(B) 또는 B/F나 B/T(%)를 구하였다.(Fig. 7). 한편 항체의 특이성 검정을 위하여 Table 2와 같은 정온유지 혼합액을 만들때 T<sub>3</sub>항체에 대해서는 T<sub>4</sub>-<sup>125</sup>I를 T<sub>4</sub>항체에 대해서는 T<sub>3</sub>-<sup>125</sup>I를 각각 가하여 정온유지후 앞에서와 같은 방법으로 B/F 값을 구하였다 (Table 3) (Fig. 8).

### 5) T<sub>3</sub> 및 T<sub>4</sub> RIA 확립실험

T<sub>3</sub> 및 T<sub>4</sub>의 특정단백질(TBG 등)과의 결합억제제로 ANS (300µg/tube)<sup>1,2,8,11,12)</sup>를 사용하고 Table 4와 같은 정온유지 혼합액을 만들어 30°C로 90분간 유지한 다음 20% polyethylene glycol 수용액 1 ml씩을 가해 단백질 부분(T<sub>3</sub>-<sup>125</sup>I 또는 T<sub>4</sub>-<sup>125</sup>I의 항체결합 착물)을 침전시키던가 DCC 현탁액 0.5 ml씩을 가하여 항체와 결합하지 않은 T<sub>3</sub>-<sup>125</sup>I 또는 T<sub>4</sub>-<sup>125</sup>I (F)를 흡착시키

Table 2. Preparation of Incubation Mixture for Determination of Antiserum Titers

Antiserum		Diluent buffer (ml)	T <sub>3</sub> (T <sub>4</sub> ) free serum (ml)	ANS soln (ml)	labelled tracer <sup>1</sup> (ml)
Dilution ratio	ml				
blank	0	0.1	0.1	0.2	0.1
1×10 <sup>1</sup> : 1	0.1	0	0.1	0.2	0.1
1×10 <sup>2</sup> : 1	0.1	0	0.1	0.2	0.1
1×10 <sup>3</sup> : 1	0.1	0	0.1	0.2	0.1
1×10 <sup>5</sup> : 1	0.1	0	0.1	0.2	0.1

Table 3. Cross-reactivity

Ab	Dilution ratio	B/F		Crossreactivity (%)
		T <sub>4</sub> - <sup>125</sup> I	T <sub>3</sub> - <sup>125</sup> I	
T <sub>4</sub>	1×10 <sup>2</sup> :1	6.8	3.5	51
T <sub>3</sub>	1×10 <sup>2</sup> :1	0.3	4.6	5.6
T <sub>4</sub>	1×10 <sup>3</sup> :1	5.0	0.3	6.0
T <sub>3</sub>	1×10 <sup>3</sup> :1	0.01	1.3	0.8
T <sub>4</sub>	5×10 <sup>3</sup> :1	3.5	0.08	2.3
T <sub>3</sub>	5×10 <sup>3</sup> :1	0.31	—*	—
T <sub>4</sub>	1×10 <sup>4</sup> :1	1.60	0.02	1.2
T <sub>3</sub>	1×10 <sup>4</sup> :1	0.19	—	—

\*too low to measure

Table 4. Preparation of Incubation Mixtures for T<sub>3</sub>(T<sub>4</sub>) Radioimmunoassay

No.	Diluent buffer (ml)	T <sub>3</sub> (T <sub>4</sub> ) free serum (ml)	T <sub>3</sub> (T <sub>4</sub> ) standard dose (ml)	(pg)	Sample serum (ml)	T <sub>3</sub> - <sup>125</sup> I# (T <sub>4</sub> - <sup>125</sup> I) (ml)	T <sub>3</sub> antiserum (T <sub>4</sub> antiserum) (ml)
1	0.2	0.05	0	0	0	0.2	0
2	0	0.05	0	0	0	0.2	0.2
3	0	0	0.05	50(2500)*	0	0.2	0.2
4	0	0	0.05	100(5000)	0	0.2	0.2
5	0	0	0.05	200(10000)	0	0.2	0.2
6	0	0	0.05	400(20000)	0	0.2	0.2
S <sub>1</sub> **	0.2	0	0	0	0.05	0.2	0
S' <sub>1</sub>	0	0	0	0	0.05	0.2	0.2

\*T<sub>4</sub>

\*\*sample serum

#contained 1.5 mg ANS per ml

Table 5. Comparison of Titers and Crossreactivities of T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> Antisera

	Molar ratio		Antisera				
	in conjugate		Titer		Cross-reactivity		
	T <sub>3</sub> -BSA	T <sub>4</sub> -BSA	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>4</sub> /T <sub>3</sub>
A <sup>(18)</sup>	4.5:1	16:1	3×10 <sup>4</sup>	2.5×10 <sup>2</sup>	0.06%*	2%*	33
B <sup>(3)</sup>	6.8:1	2×10 <sup>-2</sup> :1	2×10 <sup>2</sup>	—	1.34	—	—
C <sup>(12)</sup>	17:1#	—	4×10 <sup>3</sup>	—	1.8	—	—
D <sup>(17)</sup>	—	—	—	—	0.2	8.7	4.5
E. This work	9:1	5:1	1.5×10 <sup>4</sup>	2×10 <sup>3</sup>	0.45**	3-4**	8
A/E	0.5	3.3	2	0.13	0.12	0.6	4

\* determined by the amount of cold T<sub>3</sub> or required to cause a50% displacement of labelled hormone originally bound.

\*\* determined by B(bound)/F(free) ratio of the labelled tracer.

# T<sub>3</sub>-HSA

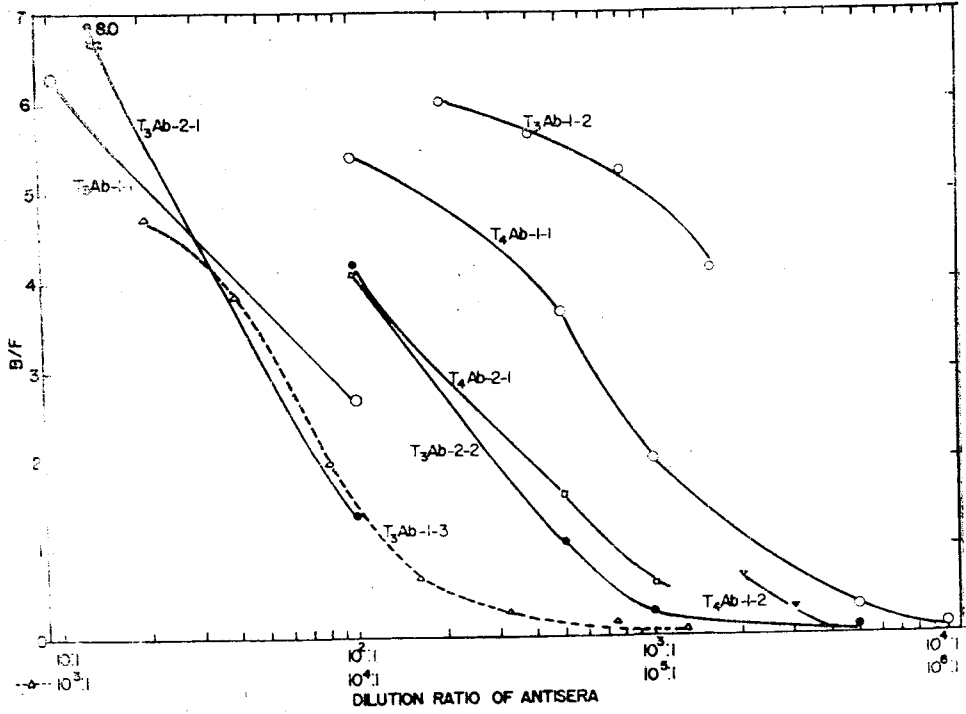


Fig. 7. Antiserum titers

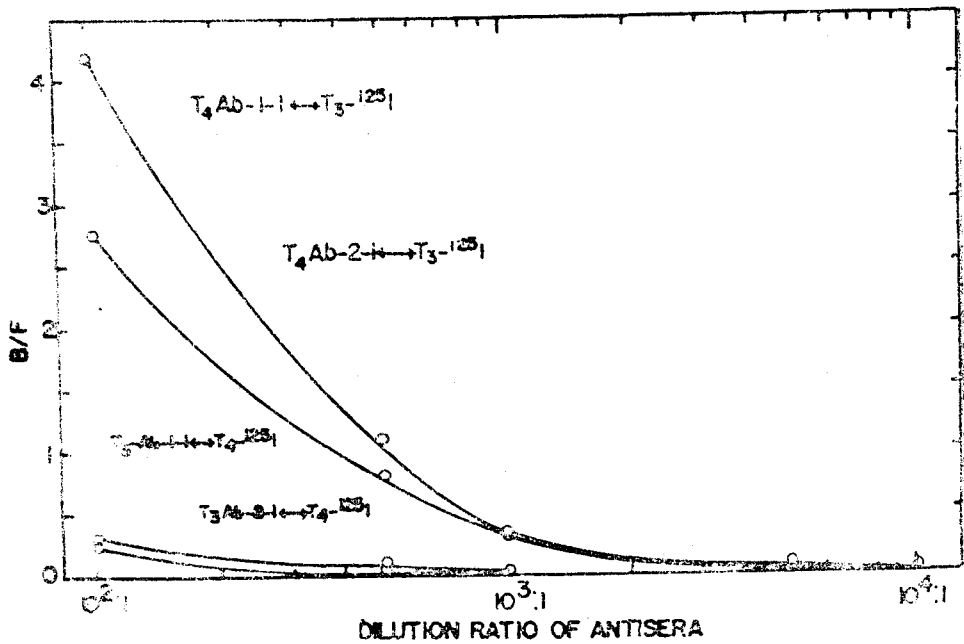


Fig. 8. Cross-reactivities of the antisera

고 원심분리하여 방사능을 측정하고 전체방사능(T)과 관련시켜 표준곡선을 얻고(Fig. 9, Fig. 10) 이에 따라

혈청중 T<sub>3</sub> 또는 T<sub>4</sub> 레벨을 결정하였다.

### III. 결과 및 토의

#### 1) 접합체 제조 및 확인

Table 1에서 보는 바와 같이 일반적으로 T<sub>3</sub>-BSA 제조가 T<sub>4</sub>-BSA 제조보다 용이하여 T<sub>3</sub>의 경우 BSA 1분자당 T<sub>3</sub> 8~9분자가 접합되어 사용한 T<sub>3</sub>의 약 19%가 BSA와 반응한 반면 T<sub>4</sub>의 경우는 BSA 1분자당 T<sub>4</sub> 4~5분자가 결합되어 사용한 T<sub>4</sub>의 약 18%가 BSA와 반응하였다. T<sub>3</sub>의 경우 문헌의 방법<sup>12)</sup>에 의하면 반응이 비교적 순조로우나 T<sub>4</sub>의 경우는 물에 대한 용해도가 작아 T<sub>3</sub>때의 방법을 그대로 적용시킬 수 없어서 DMF의 양을 T<sub>3</sub>때에 비해 증가시키는 반면 T<sub>4</sub>양은 T<sub>3</sub>때에 비해 감소시킴으로써, 반응도중 침전물 생성을 방지할 수 있었다. BSA 1 mole 당 T<sub>4</sub>의 접합비율은 T<sub>3</sub>에 비해 낮지만 반응수율은 거의 모두 20%가 까우므로 T<sub>4</sub>의 양을 T<sub>3</sub>와 대등하게 증가시키면서 DMF도 증량한다면 BSA mole 당 T<sub>4</sub>의 접합비율도 T<sub>3</sub>와 대등하게 할 수 있다고 생각된다.

Table 1이 보이는 바와 같이 pH 9인 알칼리성 용액에서 반응시킬 경우는 T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> 모두 용해도가 증가하나 반응수율이 너무 낮아 접합체를 확인할 수 없었거나 반응도중 점성있는 침전물이 생성되어 반응 및 분리, 확인이 곤란하였다. 그와같은 침전물은 T<sub>4</sub>끼리 연결된 거대분자거나 BSA 끼리 연결된 거대분자로 생각되나 아직 확실하지 않다. 일단 생성된 침전물은 pH에 무관하게 용해되지 않으므로 기계적 방법에 의한 분석이 곤란하였다. T<sub>4</sub>를 ethylester 화한 경우에도 역시 불안정하여 황갈색으로 쉽게 착색되었으며 반응 자체는 순조로우나 BSA와의 접합비율과 반응수율은 너무 낮았다(Table 1).

T<sub>4</sub> ester와 작용시키는 이유는 T<sub>4</sub> 자체 사이 및 BSA 자체사이의 반응을 억제하여 T<sub>3</sub>-BSA나 T<sub>4</sub>-BSA를 비교적 순도높게 얻으려는 데 있다. T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, BSA 등은 모두 carboxyl end와 amino end를 가지므로 아래와 같은 부반응을 생각하게 된다.

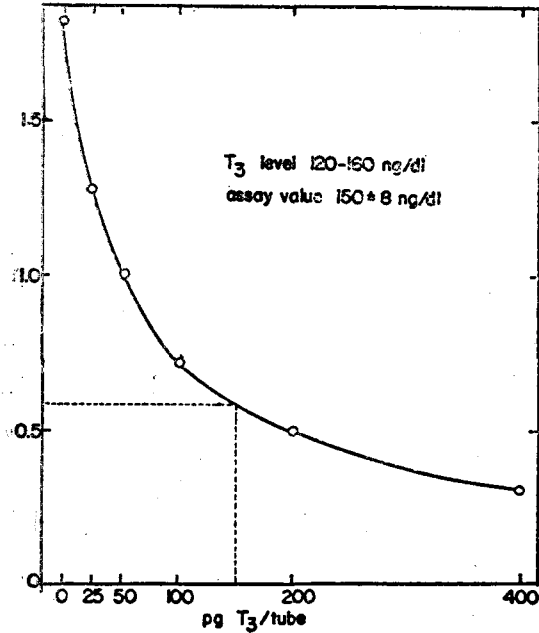
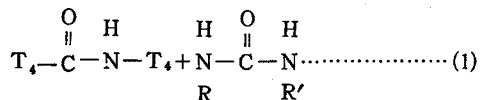
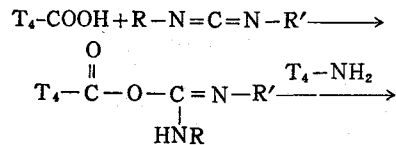


Fig. 9. Standard dose-response curve for T<sub>3</sub> RIA

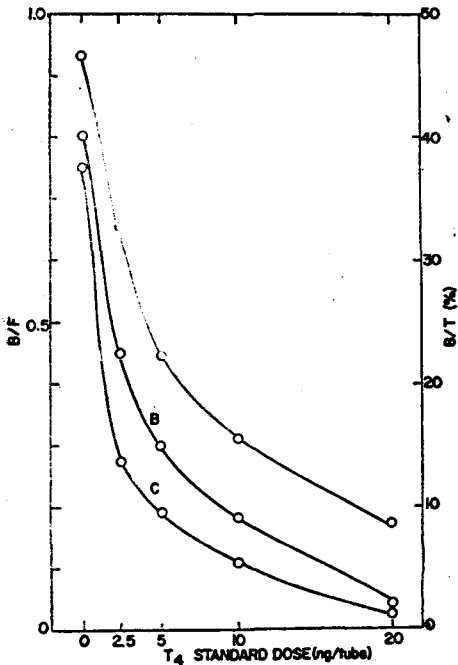


Fig. 10. Standard dose-response curves for T<sub>4</sub> RIA. (A; B/T (%), value of non-specific binding (NSB) not corrected, B; B/T (%), NSB corrected, C; B/F ratio, NSB corrected)

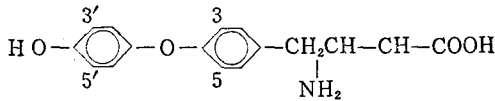




titer는  $T_3Ab-1-3$ 의  $1.5 \times 10^4 : 1$ 이며  $T_4$  항체의 가장 높은 titer는  $T_4Ab-1-1$ 의  $2 \times 10^3 : 1$ 이어서  $T_3$  항체는  $T_4$  항체가 보다 약 8배 높다.

Meinhold 등<sup>8)</sup>에 의하면 BSA: $T_3=1:4.5$ , BSA: $T_4=1:16$  등으로  $T_3$ 의 접합비율이  $T_4$ 의 그것보다 크나 그 항체는 반대로  $T_3$   $2.5 \times 10^4 : 1$ ,  $T_4$   $1 \times 10^3 : 1$ 로써  $T_3$ 의 경우 본 연구에서의 값보다 높으나  $T_4$ 의 경우는 오히려 낮다. 일반적으로  $T_3$ -BSA에서의 접합비율이  $T_4$ -BSA에서의  $T_4$  접합비율보다 높으며<sup>9,10,17)</sup> 생성항체라도  $T_3$  항체쪽이  $T_4$  항체보다 높다. 그러나 그와같은 원인에 대한 토의는 없다.

Table 3 및 Fig. 8의 결과로 보아 교차반응성은  $T_4$  항체의 경우가  $T_3$  항체보다 7~8배 큰 것으로 나타났고 일반적으로 희석비율이 커지면 점차 감소하는 경향이 뚜렷하다. Table 1, Fig. 7, Fig. 8, Table 3의 결과를 종합할 때  $T_4$  항체가 낮은 원인 및  $T_4$  항체의 교차반응성이 큰 원인들은  $T_4$ -BSA 접합체를 제조, 정제면역실험등을 하는 동안에 계속적으로  $T_3$ -BSA로 분해된다는데 있다고 생각된다. 따라서 동물체내에서도 계속  $T_3$ -BSA가 생성되면  $T_3$  항체가 상당량 생성되는 반면  $T_4$  항체는 상대적으로 저하될 것이 분명하다. 또 그렇게 될 경우  $T_3$  항체의  $T_4$ - $^{125}I$ 에 대한 반응성보다도  $T_4$  항체의  $T_3$ - $^{125}I$ 에 대한 반응성이 클 것이다.  $T_4$ 이 불안정성은  $^{125}I$ 로 표지한 경우 두드러지게



나타나며 특히 3', 5' 위치에 두개의  $^{125}I$ 가 도입될 경우는 매우 불안정하다. 그와같은 원인은 tyrosine ring의 OH에 의해 그 ortho 위치가 쉽게 활성화되며 C-I 결합에너지가 비교적 적은데다  $^{125}I$ 의 방사성 붕괴에 의한 decay catastrophe가 발생하기 때문이다.  $T_4$ -BSA의 경우에도  $T_4$  residue는 불안정하여  $T_3$ 로 넘어갈 가능성을 배제할 수 없다.

Table 3 및 Fig. 8의 data는  $T_3$ - $^{125}I$  및  $T_4$ - $^{125}I$ 의 비방사능의 거의 같다는 가정하에 이루어진 실험결과이다. 그러나 실제로는  $T_4$ - $^{125}I$ 의 비방사능이 매우 높은 편임으로 이를 고려할 경우 즉  $T_4$ - $^{125}I$ 의 비방사능도  $T_3$ - $^{125}I$ 처럼 낮다면  $T_3$  항체에 붙는  $T_4$ - $^{125}I$ 의 방사능은 분명히 감소할 것이며 또  $T_4$  항체에 비방사능이 높은  $T_3$ - $^{125}I$ 를 붙인다면 더욱 많이 결합될 것이므로 결과적으로 교차반응성 차이는 7~8배보다도 더 커질 것이다.  $T_3$  및  $T_4$  방사면역 측정에서 있어서는 각 항

체의 항체가 높아서 높은 희석비율로 희석해서 사용하면 그만큼 교차반응성을 감소시킬 수 있어서 좋으나 본 연구로 얻어진  $T_4$  항체의 항체 희석비율은  $2 \times 10^3 : 1$ 임으로 대략 3~4%의 교차반응이 있을 것이다. 그러나 혈청중  $T_3$  level은  $T_4$  level보다 일관적으로 70~100배 적으므로 3~4%의 교차반응은 문제되지 않으며 13%의 교차반응하에서도 충분히  $T_4$  RIA가 가능하다는 보고<sup>2)</sup>도 있다.

기보된  $T_3$  항체에 대한  $T_4$ 의 교차반응성은 0.45~1.3%<sup>3)</sup>, 2~5%<sup>8)</sup>, 0.06%<sup>9)</sup>, 22%<sup>17)</sup>, 0.3~1.8%<sup>12)</sup> 등이며 본 연구로 얻은  $T_3$  항체의 교차반응성보다 일반적으로 크다. 한편  $T_4$  항체에 대한  $T_3$ 의 교차반응성은 약 9%<sup>17)</sup>, 2%<sup>8)</sup> 등으로 보고되어 있으므로 본 연구로 얻은  $T_4$  항체의 교차반응성(3~4%)은 2% 보다는 많으나 비교적 좋은 편이다.

본 연구에서는  $T_3$ -BSA 접합비율 8~9:1  $T_4$ -BSA 접합비율 4~5:1에서  $T_3$  항체가  $1.5 \times 10^4 : 1$ ,  $T_4$  항체가  $2 \times 10^3 : 1$  교차반응성은  $T_4$  항체가  $T_2$  항체의 7~8배 적정  $2 \times 10^3 : 1$ 에서 3~4%의 교차반응성으로 얻어진 반면 (Table 5) Meinhold 등<sup>8)</sup>의 결과는  $T_3$ -BSA 접합비율 4.5:1,  $T_4$ -BSA 접합비율 16.3:1 ( $T_4$ -HSA 20.3:1),  $T_3$  항체가  $3 \times 10^4 : 1$ ,  $T_4$  항체가  $2.5 \times 10^2 : 1$ ,  $T_4$  항체 교차반응성은  $T_3$  항체의 32배, 적정 titer  $2.5 \times 10^3 : 1$ 에서 약 30%의  $T_3$ 와의 교차반응성 등으로  $T_3$  항체는 우수하나  $T_4$  항체는 본 연구에서의 것보다 불량하다. 면역조작에서 동물체내에서의  $T_4$ -BSA의  $T_3$ -BSA로의 분해 정도에는 큰 차이가 없을 것이나 접합체의 제조 및 정제조작에서도 상당량의 분해가 수반될 수 있다는 것을 Table 5의 결과가 보여주고 있다. 따라서  $T_4$  접합체 제조는 냉실에서 실시하여 정제해야 하며 면역실험 할때까지 냉암소에 보관하는 것이 매우 중요함을 알 수 있다.

### 3) $T_3, T_4$ RIA 확립

Fig. 9 및 Fig. 10에서 보는 바와 같이 비교적 가파른 dose gradient를 가진  $T_3$  및  $T_4$  RIA 표준곡선을 얻을 수 있었으며  $T_3, T_4$  free serum의 농도에 따라서 항체와 착물을 이루는  $T_3$ - $^{125}I$  또는  $T_4$ - $^{125}I$ 의 양이 달라짐을 알 수 있었다.

Fig. 10에서 보는 바와 같이 비특이적결합(nonspecific binding, NSB) 계측치를 보정하고 B/T(%)를  $\nu$ 축에 잡을 경우 더욱 dose gradient가 커짐을 알 수 있다.

측정대조혈청(reference control serum, ORTHO)

중의 T<sub>3</sub> level 은 120~160 ng/dl 인데 실측치는 150 ng /dl(150±8)이며 T<sub>4</sub> level 은 8±0.1인데 실측치는 7.7 ±0.4로써 좋은 일치율을 보였고 standard 를 바꾸거나 방사성추적자를 새로 만들어 측정하여도 변함이 없었다. 이 accuracy 및 reproducibility 는 대략 문헌<sup>(16,17)</sup>의 것과 비슷하므로 생산한 항체는 T<sub>3</sub> 및 T<sub>4</sub> RIA 로 이용될 수 있음이 입증되었다.

#### IV. 결 론

1) T<sub>3</sub>-BSA 및 T<sub>4</sub>-BSA 는 Morpho CDI 를 coupling agent 로 사용하여 pH 5.5에서 12시간 정도 실온 하 (10~20°C)에 반응시키는 것이 효과적이며 특히 T<sub>4</sub>의 경우는 DMF 를 충분히 가해야 침전생성을 막을 수 있다.

2) 제조한 T<sub>3</sub>-BSA 및 T<sub>4</sub>/BSA 의 결합 mole 비율은 각각 8~9 : 1 및 4~5 : 1이었다. 이들을 사용하여 얻은 항혈청의 RIA 용 적정 희석비율은 각각 1.5×10<sup>4</sup> : 1 및 2×10<sup>3</sup> : 1이었으며 교차반응성은 T<sub>4</sub> 항체가 T<sub>3</sub> 항체에 비해 7~8배 컸다. 따라서 T<sub>4</sub> 항체가 낮게 얻어지는 이유는 T<sub>4</sub>-BSA 의 결합비율이 낮다는 사실 이외에 T<sub>4</sub>-BSA 결합체 제조, 정제, 면역등 일련의 과정에서 T<sub>4</sub>-BSA 의 T<sub>3</sub>-BSA 로의 분해에 기인한다고 본다

3) T<sub>3</sub>나 T<sub>4</sub>를 ester 화 하지 않은채로 만든 결합체를 써서 얻은 항혈청으로도 RIA 용 적정 항혈청 희석 비율에서의 교차반응영향은 무시됨으로 T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> RIA 가 가능하였다.

#### 참 고 문 헌

- 1) Chopra: I.J. *A Radioimmunoassay for measurement of thyroxine in unextracted serum. J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 34:938, 1972
- 2) Larson, P.R. Dockalova, J, Sipula, D. and Wu, F.M.: *Immunoassay of Thyroxine in Unextracted Human Serum. ibid.*, 37:177, 1973
- 3) Liebllich, J. and Utiger R.D.: *Triiodothyronine Radioimmunoassay. J. Clin. Invest.*, 51:157, 1972
- 4) Larson. P.R.: *Direct Immunoassay of Triiodothyronine in Human Serum. ibid.*, 51:1939, 1972
- 5) Brown, B.L. Ekins, R.P. Ellis, S.M. and Reith, W.S.: *Specific Antibodies to Triiodothyronine Hormone. Nature*, 226:359, 1970

- 6) Fabri, P.J. and McGuigan, J.E.: *A Study of Antibody Production for the Radioimmunoassay of Gastrin. Dig. Dis.*, 22:(10), 902, 1977
- 7) Ballabarba, D. Marceau, M.D. Trembley, R.: *Radioimmunoassay of Thyroxine in Serum. Union. Med. Can.*, 103(4):647, 1974
- 8) Meinhold, H. and Wenzel, K.W.: *Radioimmunoassay for Triiodothyronine and Thyroxine in Unextracted Sera: Methodological Aspects and Clinical Applications. Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine*, 2:127, IAEA, Vienna, 1974
- 9) Kim, J.R. et. al.: *Studies on Thyroid Hormone Radioimmunoassay. Annual Research Report, Korea Atomic Energy Research Institute, KAERI /407/RR/140/80, 1980*
- 10) Mitsuma, T. Gerhengorn, N. Colucci, J. and Hollander, C.S.: *Radioimmunoassay of Triiodothyronine in Unextracted Human Serum. J.Clin. Endocrinol.* 33:364, 1971
- 11) Mitsuma, T. Colucci, J. Shenkman, L. and Hollander, C.S.: *Rapid Simultaneous Radioimmunoassay for Triiodothyronine and Thyroxine in Unextracted Serum. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46:2107, 1972
- 12) Gharib, H. Ryan, R.J. Mayberry, W.E. and Hockert, T.: *Radioimmunoassay of Triiodothyronine(T<sub>3</sub>): I. Affinity and Specificity of the Antibody for T<sub>3</sub>. J. Clin. Endocrinol.*, 33:509, 1971
- 13) Chopra, I.J. Solomon, D.H. Bell, G.N.: *Radioimmunoassay for Measurement of Triiodothyronine in Human Serum. J. Clin. Invest.* 50:2033, 1971
- 14) Kim, J.R. and Awh, O.D.: *Studies on the Preparation of Hapten Conjugates for Extension of Applicability of Radioligandassays, Annual Research Report, Korea Atomic Energy Research Institute, KAERI/231/RR-100/79, 1979*
- 15) Rubenstein, H.A. Butler, V.P. and Werner, C.S.: *Progressive Decrease in Serum Triiodothyronine Concentrations with Human Aging. J.Clin. Endocrinol. Metab.* 37:247, 1973
- 16) Sourgens, H. Winterhoff, H. Kemper, F.H.

Aenestoots, F: *The Relative Merits of Polyethyleneglycol as a Separating Agent in the Radioimmunoassay of Thyroid Hormones. Clin. Chim. Acta, 97:179, 1979*

17) Denning, C.E. Schick, L.A. and Boguslaski, R.C: *The Combined Radioimmunoassay of Triiodothyronine and Thyroxine. ibid., 98:5, 1979*