

# 고정화효소에 의한 단백질의 <sup>125</sup>I 표지 반응

한국에너지 연구소

김재록·박경배·오옥두

=Abstract=

## <sup>125</sup>I Labelling of Protein Using Immobilized Enzyme

Jae-Rok Kim\*, Kyung-Bae Park and Ok-Doo Awh

Korea Advanced Energy Research Institute

For an effective solid-phase labelling of protein with <sup>125</sup>I, studies on the immobilization of lactoperoxidase(LPO) on the inner wall of polystyrene tubes were carried out. Labelling of bovine serum albumin(BSA) and insulin was also practiced using the LPO immobilized tubes.

The immobilized enzyme of about 2.5 μg/tube was sufficient for small scale labelling since the results of radio-paper chromatography of the labelling mixture of insulin indicated that the yields were sufficiently high(80%) even in the reactions conducted at room temperature for 60 sec. The results of the Sephadex column chromatography indicated that the labelled products were not contaminated with LPO-<sup>125</sup>I, and the radiochemical purity of the products was more than 90%.

In considering the general trend that the <sup>125</sup>I labelled protein obtained by using LPO maintains its intactness better than those obtained by using chloramine-T, together with the tendency of yield enhancing with increase of reactants-concentration, the LPO immobilized tube method is estimated to be one of the simple methods of labelling. The product might be applicable without further purification.

### 서론

방사성요오드(<sup>131</sup>I 및 <sup>125</sup>I)표지단백질류는 대사연구, 진단용방사성의약품, 방사면역측정용 추적자 등으로 많이 이용되고 있으나 실제로 과도표지에 의한 intactness의 손실 또는 불안정성 등으로 예기치 않은 결과를 얻거나 소기의 목적을 달성치 못하게 되는 경우가 흔히 있다. 표지반응은 주로 단백질분자중 tyrosine ring의 -OH기의 ortho 위치에 친전자치환기작에 따라 방사성요오드화가 일어나게 되며 이때 사용하는 Na <sup>131</sup>I나 Na <sup>125</sup>I의 요오드산화제는 ICl<sup>1,2)</sup>, Chloramine-T<sup>3,4)</sup>, Lactoperoxidase(LPO)<sup>5~7)</sup>등이다. ICl을 사용할 경우는 <sup>127</sup>ICl과 Na\*I와의 교환반응에 의하여

\* 본 논문은 한국과학재단의 연구비 보조로 이루어 졌음.

\*ICl을 얻은 다음 \*ICl(+<sup>127</sup>ICl)이 반응에 참여하여 비방사성 <sup>127</sup>I가 상당량 도입됨으로 단백질표지반응용 산화제로 부적하며 Chloramine-T는 역시 온화한 산화제로 보기 곤란할 만큼 일시에 산화작용을 발휘하며 단백질중의 -S-S- 결합도 일부 산화시키는 것으로 추정되는 등 단백질손상을 일으키기 쉽다. 따라서 산화효소인 Lactoperoxidase가 가장 효과적인 산화제라고 볼 수 있으나 그 자신도 단백질이므로 \*I로 표지되며 실제로 표지하려는 단백질과의 분자량차이가 작거나 거의 같은 경우는 이들 두 표지단백질간 상호분리가 곤란하여 이 산화효소를 표지반응에 이용하기 어렵다. 따라서 그와같은 여건하에서도 온화한 산화제인 Lactoperoxidase를 사용하여 원래의 단백질 성질을 거의 그대로 유지하는 방사성요오드표지단백질을 얻는 방법이 연구개발되어야 한다.

이러한 관점에서 Sepharose-4 B 입자를 먼저 CNBr 로 활성화한 다음 LPO 를 고정화하여 표지반응 시키는 고상법(solid phase method)이 David 에 의하여 최초로 보고되었다<sup>9)</sup>. 그 후에도 Sepharose-6B<sup>10)</sup>, Polyacrylamide<sup>11)</sup> 등을 사용하여 LPO 를 고정하여 여러가지 단백질류를 표지반응시킨 보고가 있다. 그러나 이들 고상물질들은 때로는 방사성요오드를 흡착하여 표지수율을 감소시키는 단점이 있다. 또한 실제로 표지반응을 시킬 때에는 LPO 고정입자를 시험관에 넣고 반응종결후, 원심분리하여 표지반응 생성물질과 분리하여야 한다. 따라서 LPO 를 시험관의 내벽에 고정하면 그 분리가 더욱 간편해질 수 있다.

본 연구에서는 갑상선 호르몬항체의 플라스틱시험관 내 고정화연구<sup>12~14)</sup> 및 인슈린의 LPO 에 의한 표지반응 연구<sup>8)</sup>등을 토대로 하여 LPO 를 플라스틱시험관 내벽에 고정화하기 위한 효과적 방법과 그것을 이용한 최적표지반응조건을 확립하였으므로 이를 보고하는 바이다.

## 실험 및 방법

### 1. 실험재료 및 기기

본 연구에 사용된 모든 시약은 순도가 높은 1급시약으로서 정제하지 않고 그대로 사용하였다.

- Bovine serum albumin(BSA), Sigma
- Sodium borohydride, Aldrich
- Glutaraldehyde, 25%, Polyscience
- Barbituric acid, sodium salt, Sigma
- Ethanolamine, Aldrich
- Glycine, Sigma
- Sodium azide, Sigma
- Lactoperoxidase(LPO), from milk, powder, 82 U/mg, A<sub>412</sub>/A<sub>280</sub>=0.9, Sigma
- Insulin, porcine, recrystallized, 25.5 U/mg, Schwarz/Mann
- <sup>125</sup>I, carrier and reducing agent free, IMS-300, RCC
- Merthiolate, Sigma
- Hydrogen peroxide, 30%, E. Merck
- Sephadex G-50, 10~40 μ, Sigma
- Polystyrene 시험관 : 12×75 mm, Fisher
- Gamma counter, Well type, Polyspec Research Spectrometer, Baird Atomic Model 801
- Fraction collector, Minitype, Mitamura Riken Kogyo

### 2. 실험 방법

#### 1) LPO 의 고정화

25%글루타르알데히드 용액에 탄산염완충용액(0.5 M, pH 9.5)을 가하여 2.5%글루타르알데히드 용액을 만들고 이 용액 0.05~0.2 ml를 시험관에 넣어 45°C 에서 50~60분간 반응시킨 다음, 미반응 글루타르알데히드 용액을 제거하고 시험관을 증류수로 충분히 세척한다. 이 시험관에 바르비탈염완충용액(0.078M, pH 8.6)으로 녹여 만든 0.5% LPO 용액 0.05~0.2 ml를 넣고 실온에서 1시간 방치한 다음 미반응 LPO 용액을 제거하고 시험관을 증류수로 충분히 세척한다. 이렇게 만든 시험관에 10<sup>-6</sup>M merthiolate 가 함유된 인산염완충용액(0.05M, pH 7.4) 0.2 ml를 넣어 4°C에서 방치하거나 이를 동결건조시켜 보관하였다가 사용한다.

#### 2) LPO 고정화시험관을 이용한 방사성요오드화반응

BSA 의 방사성요오드 표지반응을 대표적 예로 설명하면 다음과 같다. LPO 고정화시험관속에 인산염완충용액(0.05 M, pH 7.4)으로 녹여 만든 0.25~2.5% BSA 용액 20 μl를 가한다음 Na <sup>125</sup>I 수용액(300~500 μCi/10 μl) 10 μl와 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>수용액 10 μl를 차례로 가하고 Vortex mixer 로 실온에서 일정시간(1~30분)교반하거나 손으로 흔들어서 잘 혼합한다. 일정시간 경과 후 0.25% NaN<sub>3</sub>수용액 100 μl를 가하여 반응을 종결시킨다. 반응혼합액 약 1 μl를 크로마토그래피 종이(Whatman No. 1)에 점적하고 85%메탄올을 전개용매로 사용하여 종이크로마토그래피를 실시한다. 전개후 종이를 1 cm 간격으로 잘라서 감마계측기로 그 방사능을 측정하여 표지수율을 계산한다. 한편 LPO 고정화시험관에 흡착된 방사능은 반응후에 시험관을 증류수로 충분히 세척한 다음 측정하고 전체방사능에 대한 시험관흡착 방사능비를 구한다. 실제의 표지수율은 전체방사능에서 시험관흡착방사능을 제한 용액속의 방사능비에 용액속의 표지수율(%)을 곱하여 얻는다. 같은 방법으로 3회씩 실험하여 그 평균표지수율을 구한다. 인슈린의 경우는 인산염완충용액 15 μl를 먼저 가한 다음에 pH 2의 염산수용액에 녹여 만든 인슈린 용액 5 μl를 가하여 BSA와 같은 방법으로 반응시킨다.

#### 3) 세파덱스여과에 의한 표지인슈린의 정제

Sephadex G-50칼럼(1×50 cm)을 만든 다음 용출완충용액(인산염완충용액, 0.02 M, pH 8.6)으로 2.5% BSA 용액을 만들어 칼럼을 미리 포화시킨다. 이 칼럼에 반응혼합물을 전부 가한 다음 0.1% BSA 가 함유된 용출완충용액으로 용출시켜(0.25 ml/min) 시험관

당 0.6 ml씩 받아서 각각의 방사능을 측정한다.

<sup>125</sup>I-LPO 용액 및 <sup>125</sup>I 용액도 위와 같은 방법으로 용출시켜 방사능을 측정하고 용출부피(ml)에 대한 방사능계기를 도시함으로써 각각의 피크위치를 확인한다. <sup>125</sup>I 표지 인슈린의 방사화학적 순도는 용출액의 전체 방사능에 대한 표지인슈린의 방사능을 백분율로 표시하였다.

## 결 과

### 1. LPO의 고정화 및 BSA의 방사성요오드화반응

폴리스티렌이나 폴리프로필렌과 같은 시험관의 내벽에 글루타르알데히드를 중합시켜 얇은 피막을 먼저 만들고 여기에 항체를 작용시켜 고정하는 방법은 항체의 아미노기가 글루타르알데히드중합체의 알데히드기와 공유결합하는 것으로서 공유결합법의 대표적인 예라할 수 있는데<sup>16)</sup>, 본 연구와 관련하여 이 방법을 통한 T<sub>3</sub> 항체고정 연구결과를 이미 보고한바 있다<sup>12-a)</sup>. 글루타르알데히드의 중합조건(농도, 중합온도, 시간등)에 따라서 고정되는 항체의 양이 변하며 중합조건이 과격할수록 고정되는 항체의 양은 많아지는 반면, 항원의 비특이성결합이 증가함을 알았다.

시험관내에서 2.5%글루타르알데히드를 45°에서 50~60분간 처리하면 글루타르알데히드중합체가 시험관의 내벽에 고르게 피복됨을 알 수 있었으며, 이런 독특한 방법으로 T<sub>3</sub>항체를 고정하고 미반응의 알데히드기를 수소화붕소나트륨으로 봉쇄하여 항원의 비특이성 결합을 감소시켰다<sup>12-b), 13)</sup>.

LPO의 고정도 위와같이 글루타르알데히드를 과격한 조건으로 처리하여 가능한 많은 LPO가 고정될 수 있도록 하였다. Table 1에서 보는 바와같이 0.2 ml의 글루타르알데히드용액으로 처리한 시험관을 역시 0.2 ml의 LPO 용액으로 처리한 다음 50 μg의 BSA와 <sup>125</sup>I를 실온에서 60초 반응시킨 결과 LPO의 감소에 따라 시험관에 흡착되는 방사능도 감소하였으며 50 μg 일때 시험관흡착은 23.2%이었고 BSA의 표지수율은 41.5%였다.

고정용액의 LPO 양과 부피를 더욱 감소시킨 결과, LPO 2.5 μg/0.1 ml 일때 시험관흡착은 20.3%이고 BSA 표지수율은 47.9%였다. 또한 0.05 ml 까지 글루타르알데히드 및 LPO 처리 부피를 감소시킨 결과, LPO 2.5 μg/0.05 ml 일때 시험관흡착은 20.0%이었고 BSA의 표지수율은 50.2%였다. 그 이하로 줄이면 시험관 흡착도 감소하지만 BSA의 표지수율도 현저히 감소하

Table 1. Radioiodination of Bovine Serum Albumin Using Lactoperoxidase-Immobilized Tubes\*

LPO Immobilized Tubes		Radioiodination	
Vol. of LPO soln. in coating (ml)	Amount of LPO in coating soln. (μg)	Adsorption of <sup>125</sup> I to the tubes (%)	Incorporation of <sup>125</sup> I into BSA (%)
0.2	1,000	51.4	26.0
0.2	500	46.3	27.3
0.2	250	43.8	28.4
0.2	125	34.6	35.2
0.2	50	23.2	41.5
0.1	250	26.2	43.7
0.1	125	24.5	45.2
0.1	62.5	23.6	46.9
0.1	25.0	23.0	47.0
0.1	12.5	22.5	47.3
0.1	2.5	20.3	47.9
0.05	12.50	28.8	41.2
0.05	6.25	25.3	48.6
0.05	2.50	20.0	50.2
0.05	1.25	14.7	31.4
0.05	0.25	7.4	9.7
0.05	0	0.4	—

\* Tubes were coated with different volume of LPO solution and the amounts of immobilized LPO were also different.

\*\* Fifty μg of BSA was reacted at room temperature for 60 sec.

였다. 따라서 LPO 고정용액의 부피는 0.05 ml, LPO의 양은 최저 2.5 μg 정도로 하면 시험관흡착율을 감소시킬 수 있어서 효과적일 뿐만 아니라 LPO도 절약할 수 있어서 가장 적절한 고정화조건이라 할 수 있다. 또한 글루타르알데히드만 처리한 시험관의 흡착은 0.4%로 거의 무시할 수 있다.

LPO 고정용액(2.5 μg/50 μl) 50 μl를 처리하여 고정된 LPO 고정시험관을 사용하여 500 μg의 BSA를 반응시킨 때 반응시간에 따른 시험관흡착 및 BSA의 표지수율 변화를 조사하였다. Table 2에서 보는바와 같이 반응시간의 증가에 따라 시험관흡착은 극히 약간씩만 증가하고 표지수율은 뚜렷하게 점차 증가하여 30분간 반응시키면 80.5%로서 거의 반응이 종결되는 것은

**Table 2. Variation of Yield with Reaction Time in the Radioiodination of Bovine Serum Albumin Using Lactoperoxidase-Immobilized Tubes\***

Reaction time (min)	Adsorption of <sup>125</sup> I to the tubes(%)	Incorporation of <sup>125</sup> I to BSA (%)
1	12.2	59.3
5	12.6	71.1
15	13.0	77.2
30	13.4	80.5
60	15.0	79.9

\* Tubes were coated with 50 μl LPO solution(2.5 μg/50 μl)

\*\* Five hundred μg of BSA was reacted at R.T.

**Table 3. Consecutive Radioiodination of Bovine Serum Albumin Using One Lactoperoxidase-Immobilized Tube\***

No. of radioiodination	Adsorption of <sup>125</sup> I to the tubes**(%)	Incorporation of <sup>125</sup> I into BSA (%)
1	13.8	79.4
2	10.2	64.5
3	8.9	49.8
4	5.5	25.7

\* The tube was coated with 50 μl of LPO solution (2.5 μg/50 μl).

\*\* Five hundred μg of BSA was reacted at RT for 30min.

로 생각된다. 앞의 결과들과 비교할 때 BSA의 양을 50 μg에서 500 μg로 증가시켰으므로 1분간 반응에서 시험관흡착은 20%에서 12.2%로 감소됨으로 BSA의 양과 반응시간을 연장시켰으므로 BSA의 표지수율을 높일 수 있음을 알게 된다. 이와 같은 현상은 David<sup>9)</sup>도 관측하였는데, Sepharose에 고정된 LPO를 사용하였을 때 토끼 IgG의 농도증가에 따라 흡착되는 방사능은 적었으며 30분간 반응시키면 거의 반응이 종결되었다한다. 결과적으로 BSA의 방사성요오드화반응에서 BSA 500 μg을 30분간 반응시킬 때 시험관흡착율은 13.4%이고 BSA의 표지수율은 80.5%이어서 이것이 최적반응조건임을 알 수 있다.

BSA의 최적반응조건하에서 LPO 고정시험관 1개를 사용하여 연속적으로 BSA를 방사성요오드화반응시킨 결과 Table 3에서 보는 바와같이 첫번째는 79.4%, 두

**Table 4. Radioiodination of Bovine Serum Albumin Using Different Tubes Obtained by Consecutive Immobilization of one Lactoperoxidase Solution\***

Tubes obtained in sequence	Adsorption of <sup>125</sup> I to the tubes**(%)	Incorporation of <sup>125</sup> I into BSA (%)
1st	13.5	81.2
2nd	10.6	20.2
3rd	0.2	6.5
4th	0	6.0

\* Initial concentration of LPO was 2.5 μg/50 μl

\*\* Five hundred μg of BSA was reacted at RT for 30 min.

번째는 64.5%로 BSA의 표지수율이 감소하는 것으로 보아 LPO의 산화력은 첫번째 반응때에 거의 소모된 것으로 생각된다. 한편 LPO 고정용액(2.5 μg/50 μl) 50 μl를 글루타르알데히드처리시험관에 1시간씩 방치한 다음 새시험관으로 옮겨가면서 4회 연속사용하여 LPO를 고정하였다. Table 4에서 보는바와 같이 두번째 LPO 고정시험관의 경우 BSA의 표지수율은 20.2%로 현저히 감소하였다. 따라서 시험관 1개당 고정되는 LPO의 양은 2.5 μg 정도로서 LPO 고정용액속의 LPO 2.5 μg가 거의 전부 고정된 것으로 추정할 수 있다. Thorell 등은<sup>7)</sup> 액상반응에서 4 μg의 LPO를 사용하였고 Polyacrylamide(Biogel-P-200)에 고정된 경우에는<sup>11)</sup> 약 2.9 μg의 LPO를 사용하였다. 물론 사용된 LPO의 양은 그 순도 및 활성도에 따라서 변할 수 있지만 본 연구에 사용된 LPO의 시험관내 고정법은 그 양적인 면에서도 경제적인 방법이라 할 수 있다.

시험관에 흡착되는 방사능은 첫째, LPO 자체의 방사성요오드화<sup>8,9)</sup> <sup>125</sup>I-또는 <sup>125</sup>I<sub>2</sub>의 물리적 흡착에 기인할 수 있다. 그러나 Table 1에서 보는 바와같이 LPO가 고정되지 않은 즉, 글루타르알데히드로만 처리한 시험관에서의 흡착율은 0.4%로 거의 무시할 수 있기 때문에 20%의 흡착율은 주로 LPO의 자체방사성요오드화에 기인한 것이라 할 수 있다. 둘째, LPO와 반응하고 남은 알데히드기가 방사성요오드로 표지된 BSA와 반응함으로써 일어날 수 있다. 이 자유 알데히드기를 봉쇄하기 위하여 글리신<sup>9,10)</sup>, 에탄올아민<sup>17)</sup> 등의 아미노화합물을 작용시키거나, 수소화붕소나트륨으로<sup>18)</sup> 알데히드기를 환원시키는 등의 방법이 알려져 있다<sup>12-15,18)</sup>. Table 5에서 보는 바와같이 LPO 고정시험관을 몇 가지 시약으로 처리한 결과, 에탄올아민과 글리신의

경우는 원인은 확실치 않되나 오히려 시험관흡착이 증가하였다. 수소화나트륨과 BSA의 경우는 흡착율이 12% 정도로 감소하였지만 BSA의 표지수율도 감소한 것으로 보아 LPO의 활성이 저하된 것으로 추측되며 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>는 LPO의 억제제 (inhibitor)로서 충분한 역할을 한다고 본다.

결과적으로 시험관에 대한 방사능흡착은 주로 LPO 자체의 방사성요오드화 및 <sup>125</sup>I-BSA와 알데히드기와 반응에 의한 것 등이라 할 수 있는데 이는 고정된 LPO의 양이 많을수록 높고 자유 알데히드기의 수는 한정되어 있기 때문에 BSA의 반응양이 많을수록 상대적으로 이와 반응하는 <sup>125</sup>I-BSA 수는 작아서 시험관 흡착은 감소되는 것으로 생각된다. 또한 LPO보다 방사성요오드화반응성이 좋은 물질을 반응물질로 할 때

Table 5. Variation of Radioiodination Yield with the Treatment of Various Reagents on the Lactoperoxidase-Immobilized Tubes\*

Reagents*	Adsorption of <sup>125</sup> I to the tubes** (%)	Incorporation of <sup>125</sup> I into BSA (%)
Ethanolamine(0.5%)	60.5	20.6
Glycine(0.5%)	32.8	58.3
Sodium borohydride (0.04%)	12.5	56.9
Sodium azide(0.2%)	0	7.4
Bovine serum albumin (0.1%)	12.2	76.6

\*\* See the corresponding footnotes in Table 3.

\* Reagents were treated for 1 hr. at RT.

Table 6. Variation of Yield with Reaction Time in the Radioiodination of Insulin Using the Lactoperoxidase-Immobilized Tubes\*

Reaction time (min)	Adsorption of <sup>125</sup> I to the tubes** (%)	Incorporation of <sup>125</sup> I into BSA (%)
1	27.3	57.6
10	35.8	49.0
20	40.9	44.9
30	45.4	43.0
30	2.5*	7.0

\* Tubes were coated with 50 μl LPO solution(2.5 μg/50 μl)

\*\* Five μg insulin was reacted at RT

\* Without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

에는 상대적으로 LPO 자체의 방사성요오드화는 감소될 것임으로 시험관흡착율도 줄일 수 있을 것이다.

## 2. 인슈린의 방사성요오드화 반응

BSA를 방사성요오드화하기 위해 만든 LPO 고정 시험관을 사용하여 같은 반응조건하에서 인슈린을 방사성요오드화하였다. 인슈린의 양을 5 μg으로 한정하고 반응시간별로 (1분~30분) 시험관흡착율과 인슈린의 표지수율을 조사한 결과 Table 6에서 보는바와 같이 1분간 반응에서 시험관흡착율은 27.3%이고 인슈린의 표지수율은 57.6%였다. 반응시간이 증가할수록 시험관 흡착율은 증가하여 30분간 반응에서 45.4%였으며 인슈린의 표지수율은 43.0%였다. 이와같은 현상은 BSA 표지때에도 관찰되었는데 시험관흡착이 증가하는 이유는 LPO 자체의 표지(<sup>125</sup>I-LPO)와 표지된 인슈린(<sup>125</sup>I-인슈린)이 남은 알데히드기와 결합하기 때문이라고 생각할 수 있으며 피표지물인 인슈린의 양이 적기때문에 인슈린 표지반응 때에 그와같은 영향이 더욱 큰 것으로 생각된다. 한편 표지반응때에 과산화수소를 가하지 않은 경우 즉, 고정된 LPO 자체만에 기인한 흡착율은 2.5%에 불과하며 인슈린의 표지수율은 7.0%였다. 따라서 과산화수소는 반응개시제로서 LPO와 함께 <sup>125</sup>I-를 <sup>125</sup>I<sub>2</sub>로 산화시키는 역할을 한다고 본다.

단백질호르몬의 경우, 비방사능을 높게 하여야 방사면역측정용추적자로 이용할 때에 유리하므로 대부분의 경우 적은양(5 μg 정도)을 써서 표지반응시킨다<sup>7,11</sup>. 그러나 본 실험의 경우는 그 양이 적으면 시험관흡착율이 높아짐으로 이를 감소시키기 위해서는 30분간 반응

Table 7. Variation of Yield with the Amount of Reactant in the Radioiodination of Insulin Using Lactoperoxidase-Immobilized Tubes\*(I)

Amount of insulin(μg)	Adsorption of <sup>125</sup> I to the tubes** (%)	Incorporation of <sup>125</sup> I into insulin (%)
5	47.8	42.1
10	43.2	45.0
50	22.4	73.0
100	13.2	86.8
200	9.2	90.8

\* Tubes were coated with 50 μl LPO solution(2.5 μg/50 μl)

\*\* Reaction was carried out at room temperature for 30 min.

Table 8. Variation of Yield with the Amount of Reactant in the Radioiodination of Insulin Using Lactoperoxidase-Immobilized Tubes\*(II)

Amount of insulin( $\mu\text{g}$ )	Adsorption of $^{125}\text{I}$ to the tubes**(%)	Incorporation of $^{125}\text{I}$ into insulin(%)
5	27.5	54.9
10	27.0	45.6
20	26.3	56.6
30	25.0	59.5
40	24.0	62.0
50	22.3	77.7

\* Tubes were coated with  $50\ \mu\text{l}$  of LPO solution ( $2.5\ \mu\text{g}/50\ \mu\text{l}$ )

\*\* Reaction was carried out at room temperature for 60 sec.

시키는 것보다는 1분간 반응시키는 것이 더 효과적이었다.

시험관흡착율을 줄임과 동시에 인슈린의 표지수율을 높이기 위하여 인슈린양을 증가시켰더니 Table 7에서 보는바와 같이 그 양이 증가할수록 시험관흡착율은 감소하고 표지수율은 증가하였다. 인슈린  $200\ \mu\text{g}$ 를 쓸 경우 30분간 반응에서 시험관흡착율은 9.2%로 현저히 감소하였으며 그 표지수율은 90.8%로 증가하였다. 따라서 피표지물질의 양을 증가시키으로써 비고정액상반응에서와 같이 표지수율을 높일 수 있으나 높은 비방사능의 표지인슈린을 얻기는 곤란하다.

가능한 한 인슈린의 양을 적게 사용하면서 그 표지수율을 높이기 위하여 인슈린을  $5\ \mu\text{g}$ 에서  $50\ \mu\text{g}$ 까지 증량사용하여 1분간씩 반응시켰더니 Table 8에서 보는바와같이,  $50\ \mu\text{g}$ 일때 시험관흡착율은 22.3%이고 그 표지수율은 77.7%였다. 이것은 Table 7의 결과와 비교할 때,  $50\ \mu\text{g}$ 을 30분간 반응시키에 따라 시험관흡착율은 22.4%, 인슈린의 표지수율은 73.0%로 시험관흡착율은 비슷하지만 인슈린의 표지수율은 1분간 반응시킬 때가 약간 높았다.

폴리아크릴아미드젤에 고정된 LPO의 경우<sup>11)</sup> 인슈린  $5\ \mu\text{g}$ 일때 젤에 흡착되는 방사능과 인슈린의 표지수율은 각각 20%, 64%였다. 본 연구실에서의 실험결과에 의하면 사용한 인슈린의 양이 문헌<sup>11)</sup>보다 10배 많은  $50\ \mu\text{g}$ 을 사용할 때, 표지수율이 78%여서 문헌치보다 14% 높아진다. 따라서  $^{125}\text{I}$ 를 과량사용함으로써 표지수율 및 비방사능의 제고가 가능하게 되어 그것을 희

석하여 이용할 수도 있다.

한편, 방사성추적자로서의 요건중 비방사능이 높게 높은 수율로 표지되는 것도 중요하겠으나 특히 단백질인 경우에 너무 비방사능이 높으면 단백질변성의 원인이 될 수도 있다. 보통 1개의 단백질 분자당 1개 이하의  $^{125}\text{I}$  원자가 도입되어야 단백질 분자의 성질을 유지할 수 있어 완전표지화합물에 가장 가까운 방사성동위원소 표지화합물이라고 생각되며 그렇게 될때 decay catastrophe에 의한 방사선분해나 2차 방사선분해효과까지도 방지할 수 있어서 안정화되며 이상적인 추적자가 될 수 있다.

LPO를 쓸 경우는 LPO의  $^{125}\text{I}^-$ 에 대한 완만한 산화작용에 의하여 반응속도 조절이 가능함은 물론, 단백질의 산화에 의한 변성, 과오오드화에 의한 불안정화도 막을 수 있어서 효과적이다. 이상을 종합할 때에 고정된 LPO 시험관에 의한 단백질의  $^{125}\text{I}$  표지반응에서 그 표지수율이 80%에 가깝다는 사실은  $^{125}\text{I}$  표지화합물합성을 위해 매우 고무적인 결과라고 생각된다.

### 3. 세파덱스 여과에 의한 표지인슈린의 정제

인슈린  $50\ \mu\text{g}$ 을  $^{125}\text{I}$ 로 실온에서 30분간 반응시킨 다음 반응혼합물전체를 세파덱스 여과한 결과 그 분리 모양은 Fig. 1과 같이 나타났다.

피크 1(83%)은  $^{125}\text{I}$ -LPO 피크와 거의 겹쳐 나타났는데 이는 인슈린 자체에 포함된 불순물이 표지된 것인지 반응도중 인슈린의 분해에 의한 것인지는 확실치

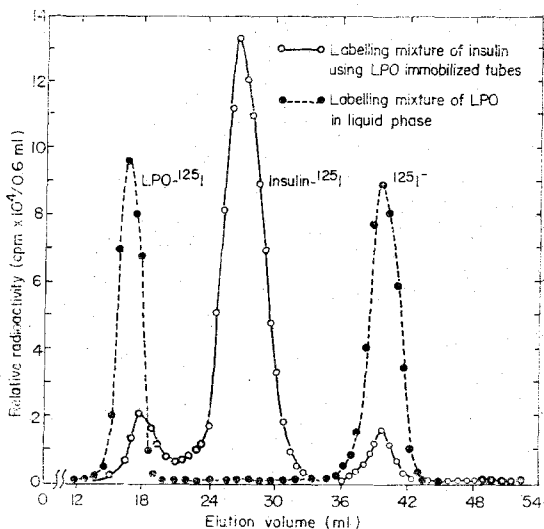


Fig. 1. A typical separation pattern in the Sephadex gel filtration of the labelling mixture

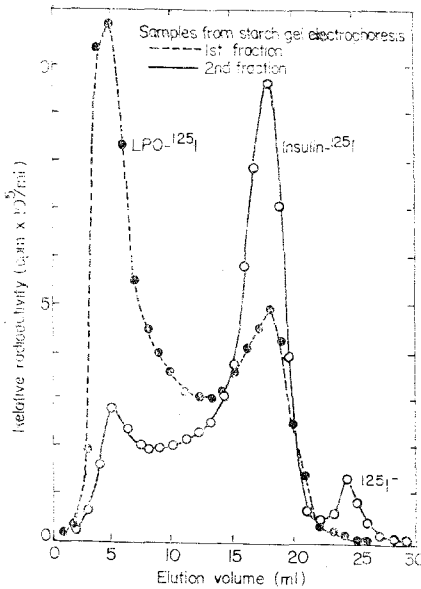


Fig. 2. A typical separation pattern in the Sephadex gel filtration of the two peak fractions obtained from the starch gel electrophoresis of the insulin <sup>125</sup>I labelling mixture.

않지만 <sup>125</sup>I-LPO 자체에 의한 것은 아니었다. 왜냐하면 LPO 고정시험관에 인슈린을 가하지 않고 요오드화 반응시켰을 때, 즉 blank test 결과 피크 1에 해당되는 것은 나타나지 않았기 때문이다. 피크 2(84.3%)는 <sup>125</sup>I-인슈린이며 피크 3(5.7%)은 <sup>125</sup>I-나 <sup>125</sup>I<sub>2</sub>에 의한 것이었다. 액상에서 인슈린을 방사성요오드화한 후 전분겔전기영동법에 의하여 일차 분리한 다음 <sup>125</sup>I-인슈린 분획에 해당되는 것을 용리하여 제차 세파덱스 여과에 의하여 정제하였더니 각 피크에 해당되는 최대 용출부피의 차이는 있지만 전체적인 분리모양은 Fig. 1과 같이 3개의 피크로 나타났다<sup>8)</sup>(Fig. 2). 또한 세파덱스여과에서는 비록 3개의 피크로 나타났지만 전분겔 전기영동법으로 분리한 <sup>125</sup>I-인슈린분획은 인슈린항체와 결합하는 면역반응성이 제일 좋았다. LPO 고정시험관을 사용하여 인슈린을 <sup>125</sup>I로 표지반응시킨 다음 정제단계를 거치지 않고 그대로 묶어서 사용하면 인슈린의 방사면역측정용으로 이용할 수 있는 충분한 가능성이 있다고 생각된다.

### 결 론

단백질 표지반응용 LPO를 고정함에 있어서 고정화 및 이용의 간편성, 표지수득율, <sup>125</sup>I의 흡착손실 감소

등을 고려하여 폴리스티렌시험관 내벽에 글루타르알데히드를 증합 피복시킨 다음 실온에서 LPO 용액을 처리하는 방법을 검토하고 시험관당 약 2.5 μg(=0.2 U)의 LPO가 고정된 시험관을 만들었다.

이 시험관들을 사용하여 BSA, 인슈린 등 단백질의 <sup>125</sup>I 표지를 위한 제반조건을 검토한 결과 80~90%의 높은 표지수득율을 얻을 수 있음을 알았다. 표지수득율은 일반적으로 실온에서 60 sec 반응시킬때 높았으며 시간이 길면 흡착량이 증가되는 반면 표지수득율은 감소되는 경향이였다. 또 반응물인 BSA나 인슈린의 농도가 클수록 시험관에 대한 흡착량은 감소하는 반면 표지수득율은 증가됨으로 인슈린의 경우 약 100 μg를 표지반응시키면 약 90%의 표지수득율을 얻을 수 있었다. BSA는 인슈린에 비해 약 10% 낮은 표지수득율을 나타냄으로 수득율은 단백질의 종류에 의존됨을 알 수 있었다. 확립된 표지방법은 종래의 액상 LPO에 의한 표지방법보다 간편할 뿐만아니라 LPO-<sup>125</sup>I에 의해 오염되지 않아 방사화학적 순도가 높은 생성물을 얻을 수 있는 장점이 있다.

또한 다른 폴리머 입자나 겔에 고정된 LPO를 사용하는 종래의 고상(固相)방사성요오드표지법에서는 흡착에 의한 방사능 손실량도 크나 본 표지방법에서는 흡착방사능손실량이 감소되었을 뿐만 아니라 원심분리가 필요치 않아 표지반응 조작성이 간편하다.

본 방법은 방사면역측정용 방사성요오드 표지화합물 합성뿐만 아니라 다른 생물학적 활성물질의 <sup>125</sup>I 표지 반응에도 이용될 수 있음은 물론 특히 단반감기인 <sup>123</sup>I (T<sub>1/2</sub>=13 h)로 표지하는 경우에는 단시간내 간편표지가 가능하여 더욱 유리하다.

### REFERENCES

- 1) McFarlane, A.S.: *Nature*, 182:54, 1958.
- 2) Izzo, J.L., et al.: *J. Biol. Chem.*, 239:3743, 1964.
- 3) Greenwood, F.C., et al.: *Biochem. J.*, 89:114, 1963.
- 4) Glover, J.S., et al.: *Ibid.*, 103:120, 1967.
- 5) Marchalonis, J.J.: *Ibid.*, 113:299, 1969.
- 6) Morrison, M. et al.: *Immun. Chem.*, 8:289, 1971.
- 7) Thorell, J.I. and Johanson, B.G.: *Biochem. Biophys. Acta*, 251:363, 1971.
- 8) Awh, O.D. and Kim, J.R.: *J. Kor. Nucl. Soc.*

- 12(2):81-87, 1980.
- 9) David, G.S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48:464, 1972.
- 10) Gilbert, L.R. and Wachsman, J.T.: *Anal. Biochem.*, 72:480, 1976.
- 11) Thorell, J.I. and Larson, I.: *Immunochem.*, 11: 203, 1974.
- 12) a. Kim, J.R., et al.: *Research Report, Korea Advanced Energy Research Institute, KAERI/RR-313:81, 1982.* b. Kim, J.R., et al.: *Research Report, Korea Advanced Energy Research Institute, KAERI/RR-363:82, 1983.*
- 13) Kim, J.R., et al.: *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine, Proc. Symp., IAEA-SM-259/51, 81-84, IAEA, Vienna 1982.*
- 14) Kim, J.R., et al.: *KAERI J.*, 3(1):50, 1983.
- 15) Piasio, R.N., et al.: *U.S. Pat.*, 4:225, 575, 1980.
- 16) Davlin, R.F.: *U.S. Pat.*, 3,951,748 1976.
- 17) Kosaka, A.: *Japan Kokai* 7,829,921 1978.
- 18) Strasburger, C.J., et al.: *Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine, Proc. Symp., IAEA-SM-259/64, 57-68, IAEA, Vienna 1982.*
-