

면역화학적 방법에 의한 Cellobiohydrolase 정량

오태광^{1*}·고영희¹·김정일¹·박관화²

¹한국과학기술원 유전공학센터 ²서울대학교 농과대학 식품공학과

Assay of Cellobiohydrolase by Column Single Immunodiffusion and Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Oh, Tae-Kwang^{1*}, Yung-Hee Kho¹, Jung-Il Kim¹ and Kwan-Hwa Park²

¹Genetic Engineering Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology, P.O.Box 131, Cheongryang, Seoul 130-650, Korea

²Department of Food Science and Technology, Seoul National Univeristy, Suwon 440-744, Korea

Antibody against cellobiohydrolase purified from *Trichoderma viride* had been obtained by injection to rabbit. The antibody had a high specificity against the cellobiohydroase evidenced by absence of immunological reaction to other isozymes from *Trichoderma viride*. Assay limit of cellobiohydrolase was 1-10 μg by column single immunodiffusion and by enzyme linked immunosorbent assay, it was 10-140 ng and 100-1200 pg when the dilution of antibody was 10^{-6} and 10^{-5} , respectively.

*Trichoderma viride*가 생산하는 섬유소 분해효소는 endoglucanase (E. C. 3. 2. 1. 4), cellobiohydrolase (E. C. 3. 2. 1. 91) 및 β -glucosidase (E. C. 3. 2. 1. 21)의 복합효소로 구성(1-3)되어 있고 섬유소 분해는 이들 효소의 상호보완적 작용(4, 5)에 의해서 이루어진다고 알려졌다. 섬유소 분해효소의 기질들은 화학구조상 중합도, 결정성 및 물에 대한 친화력이 종류에 따라 다양하게 존재할 뿐만 아니라 각각의 효소에서 분해되는 최종 산물이 유사하고 기질에 대한 특이성이 없기 때문에 현재 사용되는 환원당 정량방법(6-8)으로는 섬유소 분해효소의 각 성분을 특정화 시키기는 미흡한 실정(9, 10)이다. 이러한 미흡한 정량방법을 개선하기 위하여 사용되는 면역학적 항원 항체반응은 고도의 특이성과 민감성을 갖기 때문에 특이한 성분을 분리, 동정 및 정량(9-12)하는데 이용되어 왔다. 섬유소 분해효소에 대한 면역학적 연구는 Hakansson(13) 등이 *Trichoderma* sp. 의 endoglucanase에 대한 항체로 효소의 분리동정에

이용한 이후 Wood 등(14)은 *Penecillium* sp.가 생산하는 2개의 cellobiohydrolase간의 면역학적 특성 차이에 관한 연구 및 Award 등(11)의 Avocado가 생산하는 섬유소 분해효소의 면역학적 동일성은 조사한 연구 등이 있다. 섬유소 분해효소의 면역학적 정량은 Montenocourt 등(15)이 면역침강반응을 이용하여 *Trichoderma* sp. 변이균주 간의 cellobiohydrolase의 양을 결정한 연구와 Nummi 등(16, 17)이 *Trichoderma* sp.의 cellobiohydrolase의 양을 single radial immunodiffusion 방법으로 정량한 연구가 있지만, 단순한 침강반응을 이용하기 때문에 정확한 정량방법으로 이용하기는 미흡한 실정이다.

본 연구는 *Trichoderma viride*에서 분리된 cellobiohydrolase를 항원으로 토끼에 주사하여 항체를 얻고 column single immunodiffusion 및 enzyme linked immunosorbent assay 방법에 의해서 섬유소 분해효소중 cellobiohydrolase을 정량하는 방법을 개발하기 위하여 실시하였다.

Key words: ELISA assay, cellobiohydrolase, *Trichoderma viride*

* Corresponding author

재료 및 방법

재 료

실험에 사용한 토끼는 국립종축장(성환)에서 분양 받은 24마리의 순종토끼(California White 산)중 체중(3kg)이 비슷한 6마리를 사용하였고, Bovine Serum Albumin, Agarose 및 Antirabbit IgG Alkaline Phosphate Conjugate 등은 Sigma Chemical Co. (U. S. A.)에서 구입하여 사용하였다.

항체 제조

토끼에서 cellobiohydrolase 항체생산을 위한 첫번째의 항원주사는 정제된 cellobiohydrolase(18)을 Phosphate Buffer Saline(이하 PBS로 표기)에 1 mg/ml 농도로 녹인 용액과 동일용량의 Freund's Complete Adjuvant(Dynatech)를 넣고 균질화시킨 용액 1ml를 토끼 양뒷발의 발바닥(foot pad)에 0.5 ml씩 주사하였다. 재 접종은 첫번째 주사한 후 20일간격으로 첫번째 주사와 동일한 방법으로 Freund's Incomplete Adjuvant을 혼합하여 한마리당 1ml를 토끼 등의 피하에 0.1ml씩 10군데에 주사하였다. 실험용 혈액은 토끼의 오른쪽 귀 정맥에서 매회 2 ml씩 채혈하였고, 항체의 량이 많이 되었을 때에 토끼의 오른쪽 귀 동맥을 자른후 진공펌프를 이용해서 채혈하였다. 채혈된 혈액중 혈청은 4°C, 2,500g에서 30분간 원심분리하여 -50°C의 냉동기에 보관하여 사용하였다.

면역학적 특성시험

항원에 대한 항체의 면역학적 반응성을 ring test 및 double immunodiffusion 방법(19)에 의하여 측정하였다. Ring test는 100 ml의 capillary test의 하단에 항혈청을 1/3가량 채우고 그 위에 항원을 채운 후, 경계면에 흰색 환의 생성여부로 면역반응성을 보았다. Double immunodiffusion은 1% agarose와 3% polyethylene glycol 4,000을 혼합하여 double immunodiffusion용 판위에 굳힌 후 항원 및 항체로 중심간 거리가 0.85cm인 원형 well(0.5 cm ϕ)에 시료 20 μ l씩 넣고 humid chamber에서 하루밤 방치한 후 면역침강선의 발생여부로 판단하였다.

Column single immunodiffusion 방법에 의한 정량

Column Single Immunodiffusion(CSID)은 Larrow 방법(20)을 변형하여 사용하였다. 즉, 1%의

agarose와 3% polyethylene glycol 4,000을 녹인 용액을 40°C로 냉각시킨 후에 Bovine Serum Albumin 용액(80 mg/ml)으로 희석된 항혈청 용액을 0.2 cm ϕ ×7 cm 유리관에 5 cm까지 채운 후 고형화시켰다. 고형화된 젤위에 항원 40 μ l를 가하여 미리 가습된 37°C의 chamber 속에서 일정기간 반응후 면역침강선이 생성된 거리로 cellobiohydrolase를 정량하였다.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay 방법에 의한 정량

Engvall의 방법(21)에 준하여 Enzyme Linked Immunosorbent Assay(이하 ELISA로 표기) 방법에 의해서 실시하였다. 즉, 96개의 well을 가진 microhemagglutination plate(Becton, Dickinson)에 Carbonate-bicarbonate buffer(pH 9.6)로 희석된 cellobiohydrolase 200 μ l를 37°C에서 3시간 동안 흡착시킨후 미흡착 단백질은 Phosphate Buffer Saline Tween(PBST) 용액으로 3차례 세척하였다. 시료가 흡착된 plate에 PBST로 희석된 항혈청 200 ml를 채우고 37°C에서 2시간 항원 항체반응을 시켰다. 반응 후 남은 항체를 PBST로 다시 3차례 세척하여 제거시켰다. 항원과 항체가 반응한 plate에 토끼 항체에 면역특이성이 있는 Alkaline phosphatase Conjugated Antirabbit IgG(이하 APCA-IgG로 표기)를 PBST로 희석한 용액에 반응시킨 후 미흡착 APCA-IgG는 세척하였다. 이어서, p-nitrophenyl phosphate를 10%의 diethanolamine buffer(pH 9.8)에 1 mg/ml의 농도로 녹인 기질용액을 가하여 APCA-IgG-IgG-cellobiohydrolase-plate에 흡착된 alkaline phosphatase의 역가를 측정함으로써 초기에 흡착된 cellobiohydrolase를 정량하였다.

결과 및 고찰

Cellobiohydrolase항체의 생산

*Trichoderma viride*에서 분리한 cellobiohydrolase 항원에 대한 항체의 특이성을 조사한 결과는 Fig. 1에 제시되었다. 본 실험에서 항원으로 사용된 cellobiohydrolase의 생산균주인 *Trichoderma viride* QM 9414에서 분리된 다른 isozyme과 cellobiohydrolase 항체와의 면역특이성을 조사한 결과는 Fig. 1-(b)와 같다. 항원으로 사용한 cellobiohydrolase 이외의 endoglucanase의 isozyme과 cellobiohydrolase

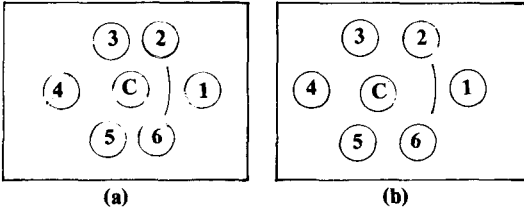


Fig. 1. Double immunodiffusion of various cellulase, enzymes (a), and separated cellulase fractions (b) against cellobiohydrolase antibody;

C: antibody of cellobiohydrolase, (a)-1 and (b)-1: cellobiohydrolase, (a)-2: *Asp. niger* cellulase, (a)-3: *Fusarium* cellulase, (a)-4: *Clostridium* cellulase, (a)-5: Amylase, (a)-6: Polygalacturonase, (b)-2—(b)-5: isozymes of endogulcanase from *Trichoderma viride*, (b)-6: isozymes of cellobiohydrolase from *Trichoderma viride*

의 isozyme과 전혀 반응을 하지 않는 것으로 나타났습니다. 즉, 토끼에서 얻은 cellobiohydrolase 항체는 항원으로 사용된 cellobiohydrolase에만 특이하게 반응하는 특이성이 있음을 알 수 있어서 혼합용액중 cellobiohydrolase만 특이적으로 정성할 수 있을 것으로 판단됩니다. *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. 및 *Clostridium* sp.가 생산한 섬유소 분해효소, amylase, polygalacturonase와 cellobiohydrolase 항원을 double immunodiffusion을 행한 결과는 Fig. 1-(a)와 같다. 즉, 본 실험에서 생산한 항체는 다른 종류의 분해효소 뿐만 아니라 다른 미생물이 생성한 섬유소 분해효소와도 면역반응성이 없는 특이성이 있음을 알 수 있었다.

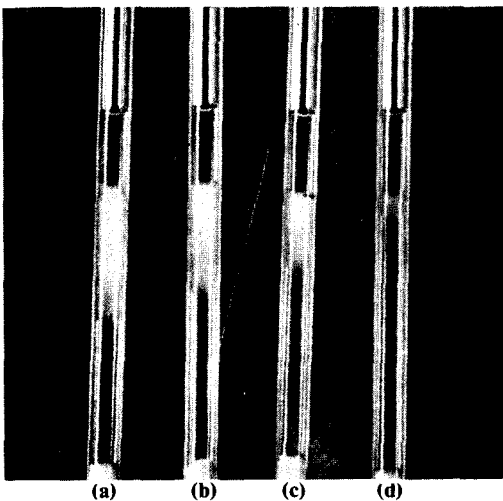


Fig. 2. Column single immunodiffusion of cellobiohydrolase at different concentrations
(a): 50ug (b); 30ug (c); 20ug (d); 10ug of cellobiohydrolase

CSID에 의한 cellobiohydrolase 정량

Cellobiohydrolase의 량에 따른 CSID 실험의 결과는 Fig. 2와 같다. 즉, cellobiohydrolase의 량이 많을수록 확산되는 거리가 멀어짐을 알 수 있기 때문에 CSID법에 의한 cellobiohydrolase의 정량이 가능함을 알 수 있었다. CSID법에 있어서 최적 확산시간을 결정하기 위해서 cellobiohydrolase를 농도별로 37°C에서 확산시간을 달리한 결과 Fig. 3-(a)와 같은 결과를 얻었고, 이를 다시 Larson 방법(20)에 의해

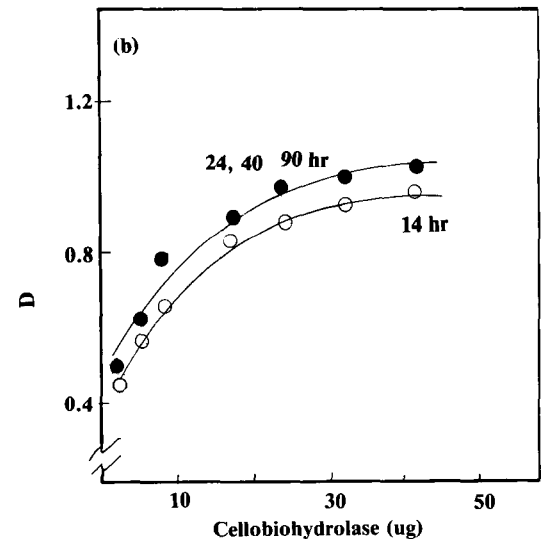
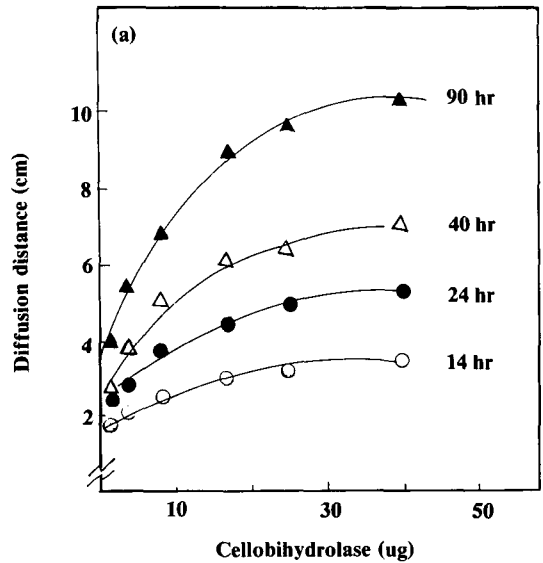


Fig. 3. Relationship among different distance (D), diffusion time(t) and concentration of cellobiohydrolase during column single immunodiffusion

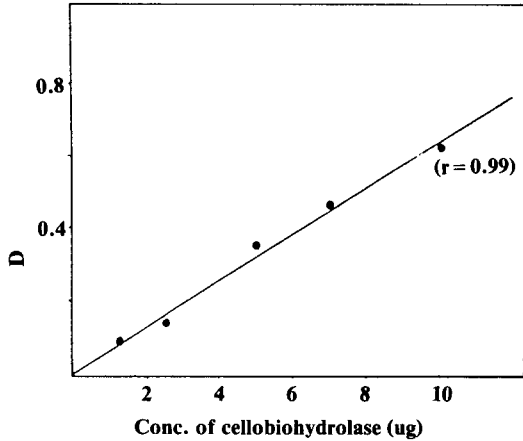


Fig. 4. Standard curve for the assay of cellobiohydrolase;

D: diffusion distance, t; diffusion time

서 확산된 거리를 시간의 제곱근으로 나누어준 값을 cellobiohydrolase의 양에 대하여 도시한 결과는 Fig. 3-(b)의 결과와 같다. 확산시간을 24시간 이상 확산시켰을 때도 동일한 결과를 갖기 때문에 반응시간을 24시간으로 결정하였다. 또한, 측정농도가 10 μg 이상에서는 직선적 관계를 보이지 않기 때문에 10 μg 이하의 농도에서 표준곡선을 구한 결과 Fig. 4와 같은 유의성이 높은 직선을 얻을 수 있었다. 이때, 측정범위는 2~10mg의 범위에서 정량이 가능하다고 생각된다. 일반적으로 사용되는 radio immunoassay, enzyme immunoassay 및 fluorescence immunoassay는 극미량물질의 정량에는 적합한 방법(22, 23)이지만 발효산물과 같은 어느 정도의 농도를 갖는 물질의 정량시는 회석으로 인한 측정오차 크기 때문에 CSID와 같은 면역확산방법이 적합한 방법으로 생각된다.

ELISA에 의한 cellobiohydrolase 정량

ELISA 방법에 사용할 항혈청의 농도 및 APCA-IgG의 최적 회석농도를 구하기 위하여 실험한 바 Fig. 5와 같은 결과를 얻었다. APCA-IgG를 1:2,000으로 회석했을 때 항혈청은 $10^5 \sim 10^6$ 범위 내에서 회석하여 사용할 수 있었다. 항혈청을 10^6 배, 10^5 배 회석했을 시 cellobiohydrolase를 정량하는 표준곡선을 Fig. 6과 같이 얻었으며, 이때 측정범위는 10^6 배 항체 회석시 40~110 ng 범위, 10^5 배 항체 회석시 100~1,200 pg 농도에서 cellobiohydrolase의 측정이 가능하였다. Ellens(22) 등은 ELISA 방

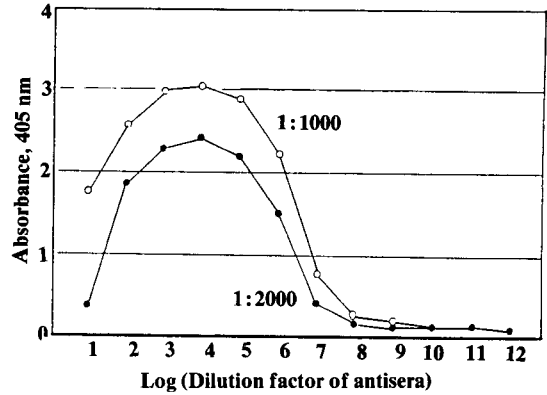


Fig. 5. Assay of cellobiohydrolase by ELISA at different dilution of antisera and alkaline phosphatase conjugated antirabbit IgG

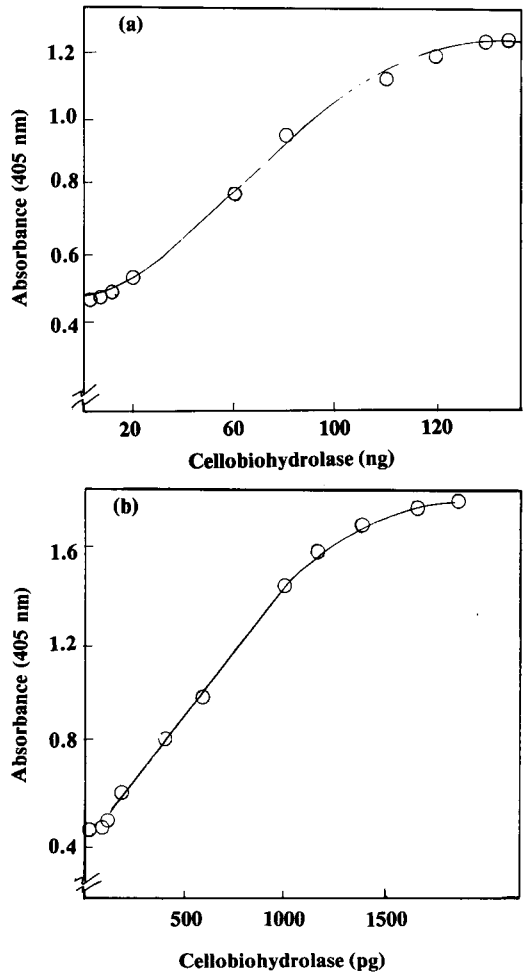


Fig. 6. Standard curve for cellobiohydrolase assay by ELISA with 10^{-6} (a) and 10^{-5} (b) dilution of antisera

Table 1. Reproducibility test of cellobiohydrolase assay by ELISA method

(Unit : Absorbance, 405 nm)

Cellobiohydrolase Quantities (pg)	mean	Standard Deviation	Maximum Value	Minimum Value
500	0.948	0.017	0.977	0.920
1000	1.477	0.015	1.478	1.420

법으로 10~20 ng 단위의 rotavirus, Adams (22) 등은 1~10 ng 단위의 plumpovirus를 정량했는데 비해서 본 실험에서는 이보다 낮은 농도범위의 cellobiohydrolase를 정량할 수 있었다. 또한, ELISA 방법으로 500 pg과 1,000 pg의 cellobiohydrolase시료를 48회씩 반복 측정할 결과 Table 1과 같은 표준편차를 가진 재현성이 높은 안정된 방법으로 나타났다.

요 약

*Trichoderma viride*가 분비하는 cellobiohydrolase를 항원으로 사용하여 이 섬유소 분해효소에만 특이적인 항체를 얻을 수 있었다. 이 항체를 이용하여 column single immunodiffusion 방법에 의해서 cellobiohydrolase의 농도 2-10 μ g 범위 내에서는 직선적으로 정량할 수 있었고, ELISA 방법을 사용할 때는 10⁶배의 항체 희석시는 40-110 ng, 10⁵배 항체 희석시는 100-1,200 pg 농도범위의 cellobiohydrolase를 정량할 수 있었다.

참고문헌

- Kaplan, A.M., Mandels, M., Pillion, E. and Greenberge, M.: *Appl. Microbiol.*, **20**(1), 85 (1970)
- Halliwell, G. and Vincen, R.: *Biochem. J.*, **179**, 409 (1981)
- Holber, H.: *Trends Biochem. Sci.*, **1**, 178 (1976)
- Ryu, D.D.Y. and Mandels, M.: *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 91 (1980)
- Wood, T.M. and McCrae, S.I.: *Carbohydr. Res.*, **57**, 117 (1977)
- Sternberg, D. and Mandels, M.: *J. Bacteriol.*, **139**, 741 (1979)
- Mandels, M., Andreotti, R. and Roche, C.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **5**, 17 (1976)
- Bailey, M.J. and Nevalainen, K.M.N.: *Enzyme Micro. Technol.*, **3**, 152 (1981)
- Nummi, M., Niku-Paavola, M.-L., Lappalainen, A., Enari, T.,-L and Raunio, V.: *Biochem. J.*, **215**, 677 (1983)
- Zhu, Y.S. and Tan, C.: *Acta. Phytophysiologia Sinica*, **4**, 4 (1978).
- Award, M. and Lewis, L.N.: *J. Food Sci.*, **45**, 1625 (1980).
- Ogawa, M., Takatsuka, Y., Kitahara, T., Matsuhira, K. and Kisaki, G.: in *Method in Enzymology*, **71**, Academic Press, 290 (1981).
- Hakansson, ULE, Lars, G., Fagerstan, L., Pettersson, G. and Andersson, L.: *Biochem., J.*, **179**, 141 (1971).
- Wood, T.M. and McCrae, S.I.: *Biochem. J.*, **234**, 93 (1986).
- Monecourt, B.S., Kellether, T.J. and Eveleign, D.E.: *Biotech. Bioeng. Symp.*, **10**, 47 (1981).
- Nummi, M., Niku-Paavola, M.-L., Enari, T.-M., and Raunio, V.: *FEBS Lett.*, **113**, 164 (1980).
- Nummi, M., NiKu-Paavola, M.-L., Lappalainen, A., Enari, T.-L., and Raunio, V.: *Biochem. J.*, **215**, 677 (1983).
- Oh, T.K. and K.H. Park: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**(3), (1988).
- John, A. and Thorpe, R.: in *Immunochemistry in Practice*, Blackwell Scientific Publications (1982).
- Larson, B.L. and Hageman, E.C.: *J. Dairy Sci.*, **46**, 14 (1963).
- Engvall, E. and Perlmann, P.: *Immunochemistry*, **8**, 871 (1971).
- Ellens, D.J. and Leeuw, P.W.: *J. Clin. Microbiol.*, **6**, 530 (1977).
- Adams, A.W.: *Ann. Appl. Biol.*, **90**, 215 (1978).

(Received April 13, 1988)