

방사면역측정을 위한 항 Gastrin 혈청의 생산 및 평가

한림대학교 의과대학 생리학교실 및 실험동물부*

박 형 진 · 권 혁 일 · 이 윤 렬
신 원 입 · 서 상 원 · 오 양 석*

(1989년 5월 1일 접수)

= Abstract =

Production and Evaluation of Anti-Gastrin Serum for Radioimmunoassay

Hyoung Jin Park, Hyeok Yil Kown, Yun Lyul Lee, Won Im Shin
Sang Won Suh and Yang Suk Oh*

Department of Physiology and Experimental Animal Center, Faculty of Medicine, Hallym University,
Kangwon-Do, Korea*

In order to produce antibody for use in radioimmunoassay of gastrin in physiological concentration, four rabbits of New Zealand white were immunized with synthetic human gastrin-17-I conjugated to hemocyanin with EDC. Among them, only one rabbit produced antibody that could bind 50% of 125 I-gastrin at a final dilution of 1:25,000. 125 I-gastrin was prepared with synthetic human gastrin-17-I and NaI^{125} by lactoperoxidase technique. The product was then purified on a column of Sephadex G15/G50 (7:3, w/w) followed by a column of DEAE sephadex A-25. The specific radioactivity of the purified 125 I-gastrin was in the range of 347-1429 $\mu\text{Ci}/\text{nmole}$ when determined by the self-displacement method. The effective affinity constant (K_{eff}), total binding sites (N), heterogeneity index (α) and average affinity constant (K_0) of the anti-gastrin serum calculated from Scatchard plot as well as Sips plot were $1.77 \times 10^{11}/\text{M}$, 255 nM, 0.84 and $0.79 \times 10^{11}/\text{M}$, respectively. When radioimmunoassay was performed with the anti-gastrin serum, it was confirmed that the mean concentration of gastrin immunoreactivity in plasma was increased by feeding in humans and rats, and also increased by bombesin administration in rats. The results indicate that the anti-gastrin serum produced in the present investigation is suitable for radioimmunological determination of gastrin in physiological concentration.

Key Words: Gastrin, antibody production, iodination, radioimmunoassay.

서 론

위(胃)에서 산(酸)의 분비를 촉진하는 작용을 지닌 gastrin이 발견된 이래(Edkins, 1905) 이 물질의 생리적 기능이 밝혀지는데까지는 상당한 기간이 소
본 연구는 1988년도 한림대학교 학술연구 조성비로 이루어진 것임.

오되었다. 그러한 이유중의 하나는 gastrin의 농도를 측정하기가 어려웠기 때문이다. 그러나 낮은 농도의 gastrin을 측정할 수 있는 방사면역측정법(radioimmunoassay)이 개발됨으로 인하여(Hansky & Cain, 1969; McGuigan & Trudeau, 1970; Yallow & Berson, 1970) gastrin의 생리학적 연구가 활발히 진행되게 되었다.

방사면역측정에 있어서 가장 중요한 문제는 적합

한 항체를 사용하는 것이다. 그 이유는 방사면역측정의 특이성 (specificity) 과 민감성 (sensitivity) 이 주로 항체에 의하여 결정되기 때문이다 (Hurn & Landon, 1971). 현재 널리 사용되고 있는 gastrin 항체는 gastrin의 생물학적 활성을 나타내는데 필수적인 C-terminal에 특이적으로 결합하는 것들이나 특정한 gastrin form을 측정하기 위하여서는 이에 적합한 항체들이 사용되고 있다. Dockray & Taylor (1976)은 gastrin-17-I에만 특이성있게 반응하고 다른 gastrin form과는 거의 반응하지 않는 항체를 사용하여 Zollinger-Ellison syndrome 환자의 혈청에서 gastrin-17-I의 농도를 선택적으로 측정할 수 있었으며, Pauwels & Dockray (1982)는 big gastrin (gastrin-34)을 측정하기 위하여 이 물질의 N-terminal에 특이성을 지니는 항체를 만들어 사용하였다. 한편 gastrin과 cholecystokinin은 C-terminal의 amino acid 구성이 유사하기 때문에 gastrin의 C-terminal에 특이하게 결합하는 항체로는 이 두 peptide를 구분하기가 쉽지 않다 (Walsh, 1987). 이러한 문제를 해결하기 위하여 Rehfeld & Morley (1983)는 gastrin 또는 cholecystokinin의 중간 부위에 존재하는 amino acid residue에 대한 항체를 만들어서 이들 두 물질을 구별하여 측정하는데 성공하였다. 본 논문에서는 Boehm et al (1974)의 방법을 다소 수정하여 gastrin-17-I에 대한 항체를 생산한 바 이 항체가 gastrin과 cholecystokinin을 구분할 수 있는 특이성을 지니고 있기에 그 결과를 보고하고자 한다.

실 험 방 법

1. Gastrin 항체의 생산

합성 human gastrin-17-I (G-17-I)을 hemocyanin에 EDC를 촉매로하여 접합시켜 항원으로 사용하였다 (Goodfriend et al, 1964; Boehm et al, 1974). 2 mg의 합성 G-17-I, 20 mg의 hemocyanin 그리고 200 mg의 EDC를 4 ml의 증류수에 넣고 상온에서 20시간 진탕하여 접합반응을 일으켰다. 반응액을 membrane tubing (Spectrapor, Spectrum Medical Inc., USA, MW cutoff; 12,000-14,000)에 넣고 4°C에서 0.9% 식염수용액으로 충분히 투석시킨 다음 0.1 ml (50 µg 상당의 gastrin 포함)씩 소분

하여 -70°C에 보관하였다. 항체생산에 사용된 토끼는 New Zealand white 계로 국립종축원에서 생후 1개월 되는 것을 분양 받았다. 매 4주마다 소분한 것 하나와 동량의 Freund adjuvant, complete를 혼합하여 충분히 유화시킨 다음 토끼의 발바다에 주사하여 면역하였다. 두번째 면역후부터 매 면역후 2주째 되는 날에 귀정맥에서 채혈하고 혈청중의 항체를 적정하였다. gastrin 항체의 역가를 측정하기 위하여 1 ml의 용액에 5,000 cpm (2.3 fmole)의 ¹²⁵I-gastrin과 연속희석한 혈청을 혼합하여 4°C에서 72시간 방치한 후 50%의 ¹²⁵I-gastrin이 결합되는 혈청의 희석 비율을 항체의 역가로 표시하였다.

2. Gastrin의 방사면역측정

표지된 gastrin (¹²⁵I-gastrin)을 제조하기 위하여 합성 G-17-I (1 µg)을 NaI¹²⁵ (1 mCi)로 옥소화 시켰으며, 산화제로는 H₂O₂를 그리고 촉매로는 lactoperoxidase를 사용하였다 (Tai & Chey, 1976). 옥소화된 G-17-I을 정제하기 위하여 위의 반응물을 10 ml 용량의 Sephadex G15/G50 (7:3 w/w), fine column에 통과시킴으로서 G-17-I에 결합하지 않은 NaI¹²⁵를 제거하였다 (Fig. 1-A). 이 과정에서 전체 NaI¹²⁵의 20.8%가 G-17-I과 결합한 것으로 나타났다.

옥소화된 G-17-I의 분획 (Fig. 1-A에서 점을 찍어 표시한 부분)을 한데모아 1 ml 용량의 DEAE sephadex, A-25 column에 부하하고 NH₄HCO₃의 농도를 100 mM에서부터 직선적으로 증가시키면서 용출하여 ¹²⁵I-gastrin을 정제하였다 (Fig. 1-B). 최종적으로 정제된 ¹²⁵I-gastrin의 특수방사능 (specific radioactivity)은 self-displacement 법 (Stadil & Rehfeld, 1972)으로 측정한 결과 347-1, 429 µCi/nmole 이었다. 특히 본 실험에 사용한 ¹²⁵I-gastrin의 특수방사능은 1, 215 µCi/nmole이었으며 면역성함량 (immunoreactive content)은 81.2%를 나타내었다.

방사면역측정은 목적에 따라 두가지 방법으로 나누어 시행하였다. 혈장 gastrin 농도 및 다른 peptide와의 교차반응성 (cross-reactivity)를 측정할 때에는 항체와 혈장 또는 희석한 peptide를 우형청단백을 0.1% 함유하는 50 mM Tris buffer (pH 7.8) 1.5 ml에 넣고 4°C에서 24시간 preincubation한 다음 5,000

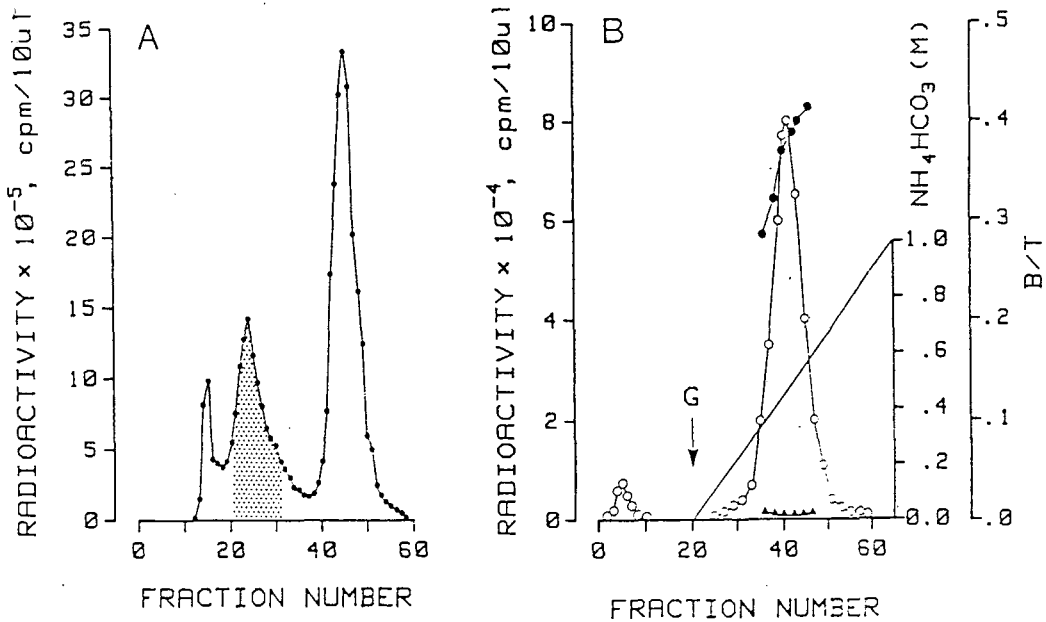


Fig. 1. Purification of ^{125}I -G-17-I. A) Chromatography of iodination mixture on a Sephadex G15/G50 (7:3 w/w), fine column. The column was equilibrated and eluted with 100 mM NH_4HCO_3 . Radioactivity in $10\ \mu\text{l}$ from each fraction (0.3 ml) was counted for 0.2 min. Fractions indicated by a dotted area were pooled for further purification. B) Purification of ^{125}I -G-17-I on a DEAE-sephadex A-25 column. Pooled fractions in A) were charged onto the column equilibrated with 100 mM NH_4HCO_3 . The column was eluted with a linear gradient of 100~1,000 mM NH_4HCO_3 , 75 ml in each reservoir. $20\ \mu\text{l}$ from each fraction (3 ml) was counted for 0.5 min. Symbols depict radioactivity (○); binding ratio after subtraction of blank (●); blanks, (▲). The arrow indicates the moment of gradient application.

cpm의 방사능을 지니는 ^{125}I -gastrin을 넣고 72시간 postincubation하였다. 항체의 친화력(affinity)과 이질성(heterogeneity)을 측정할 때에는 항체, 합성 G-17-I standard 그리고 8,000 cpm (3.7 fmole)의 ^{125}I -gastrin을 함께 넣거나 또는 항체와 8,000~695,000 cpm (3.7~318.9 fmole)의 ^{125}I -gastrin을 함께 넣고 충분히 평형상태에 이르게 하기 위하여 4°C 에서 120시간 incubation하였다. Dextran-plasma coated charcoal을 사용하여 ^{125}I -gastrin을 항체와 결합한 것과 결합하지 않은 것으로 분리하고 (Tai & Chey, 1976) 각각의 방사능을 gamma-counter (1272 Clinigamma, LKB-Wallac Co., Finland)로 2분간 측정하였다.

3. Gastrin 항체의 평가

1) 항체의 특이성 (specificity) : 본 실험에서 얻은

항체의 특이성을 알아보기 위하여 여러 peptide들과의 교차반응을 측정하였다. 측정에 사용한 peptide 중 G-17-I과 C-terminal의 amino acid서열이 일부 같거나 유사한 것으로는 human big gastrin, pentagastrin, [β -benzyl-Asp 4]-pentagastrin, gastrin related tetrapeptide, cholecystokinin-8 그리고 caerulein등이 있다. 이 외에도 motilin, secretin, bombesin, neurotensin, substance-P, vasoactive intestinal polypeptide 그리고 somatostatin 등과의 교차반응도 측정하였다.

2) 항체의 친화력(affinity) 및 이질성(heterogeneity) : 항원-항체의 반응을 열역학함수로 분석하고자 할 때에는 Scatchard plot가 많이 이용된다 (Rehfeld et al, 1972; Chang & Chey 1980). Scatchard의 식(Scatchard, 1949)을 항원-항체의 반응에 적용하면 다음과 같은 식으로 나타내어 진다

(Boehm et al, 1974).

$$B/F = K (Ab^* - B)$$

위의 식에서 B는 항체와 결합한 항원의 농도, F는 항체와 결합하지 않은 항원의 농도, K는 친화력상수 (affinity constant) 그리고 Ab^* 는 항체에 최대로 결합할 수 있는 항원의 농도이다. B/F와 B를 함수로 한 graph (Fig. 3-A)의 초기경사도 (initial slope)로부터 effective affinity constant, K_{eff} 를 얻을 수 있으며 (Ekins, 1971), Ab^* 의 값으로부터 총 결합부위 (total binding sites, N)를 구할 수 있다 (Klotz & Hunston, 1971). 대부분의 항체는 친화력에 있어서 어느정도 이질성을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Eisen et al., 1964; Haber et al., 1967). 항체의 이질성지수 (heterogeneity index, α)와 average affinity constant, K_0 는 Karush의 직선회귀분석법 (Karush, 1962)을 이용한 Sips의 식 (Sips, 1948)으로 부터 다음과 같이 구할 수 있다.

$$\log B/(N-B) = \alpha \log F + \alpha \log K_0$$

본 실험에서도 위와 같은 식들을 이용하여 생산된 항체의 친화력상수 및 이질성지수를 산출하였다.

4. 사람과 흰쥐의 혈장 gastrin 농도 측정

본 실험에서 생산된 gastrin 항체를 사용한 방사면역측정법의 적합성을 검색하기 위하여 내시경검사와 병력에서 특별한 위장질환이 발견되지 않은 정상인 11명 (남자 5명, 여자 6명)과 내시경검사와 조직검사로 확진된 위암환자 중 암이 주로 위의 체부에 위치한 체부암환자 6명 (남자 4명, 여자 2명) 그리고 암이 주로 유문부에 위치한 유문부암환자 6명 (남자 3명, 여자 3명)에게 24시간 절식후 150g의 쇠고기가 함유된 hamburger와 우유 200 ml을 식사로 제공하면서 식사전 10, 0분 그리고 식사후 5, 15, 30 그리고 60분에 각각 채혈하여 공복시와 식후 혈장 gastrin 농도를 측정하였다.

또한 체중이 250~350g되는 Sprague-Dawley 계의 흰쥐 수컷을 사용하여 혈장 gastrin 농도를 측정하였다. 흰쥐 31마리를 24시간 절식시킨 다음 16마리에서는 공복시에 그리고 15마리에서는 먹이를 30분에 거쳐 먹게한 후에 각각 urethane (1g/kg)을 복강내 주사하여 마취하고 복대동맥에서 채혈하여 혈장 gastrin 농도를 측정하였다. bombesin이 gastrin

의 분비를 촉진함이 이미 알려져 있으므로 (Bertaccini et al., 1974; Ghatei et al., 1982) 이것을 확인하기 위하여 24시간 절식시킨 흰쥐 14마리를 urethane으로 마취한 다음 bombesin을 0.5 μ g/kg씩 경정맥으로 주사하기 15분전 그리고 투여후 15분에 각각 채혈하여 혈장 gastrin 농도를 측정하였다.

5. 시 약

peptide들은 모두 합성한 것을 사용하였다. human G-17-I은 Research Plus Inc. (USA)에서, sulfated cholecystokinin-8와 porcine motiline은 Bachem Inc. (USA)에서, porcine secretin과 somatostatin은 Peninsula Lab Inc. (USA)에서 그리고 human big gastrin, pentagastrin, gastrin related tetrapeptide, [β -benzyl-Asp⁴]-pentagastrin, caerulein, neurotensin, bombesin, vasoactive intestinal polypeptide, substance-P는 Sigma (USA)에서 각각 구입하였다. 또한 *Limulus polyphemus*의 hemolymph에서 추출한 hemocyanin, 1-ethyl-3-(3-diethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC)는 Sigma (USA)에서 NaI^{125} 는 Amersham (England)에서, lactoperoxidase는 Cal Biochem (USA)에서, Sephadex G-15, G-50 fine과 DEAE sephadex A-25는 Pharmacia (Swiss) 그리고 Freund adjuvant, complete는 Difco Lab. (USA)에서 각각 구입하였으며 기타 시약은 reagent grade (Sigma, USA)를 사용하였다.

실 험 성 적

1. Gastrin 항체의 생산

gastrin 항원을 3회 면역후 4마리의 토끼중 3마리에서 항체가 생산됨이 확인되었다. 그러나 7회 면역후 1마리에서만 항체의 역가가 계속 증가하였으므로 이 토끼만 계속 면역하였다. 21회 면역후 최종적으로 수확한 혈청의 gastrin 항체역가는 1:25,000이었다.

2. Gastrin 항체의 평가

1) gastrin 항체의 특이성 : 본 실험에서 얻은 gastrin 항체의 여러가지 peptide에 대한 교차반응성을 Fig. 2에 제시하며 이항체와 ^{125}I -gastrin의 결합을 방

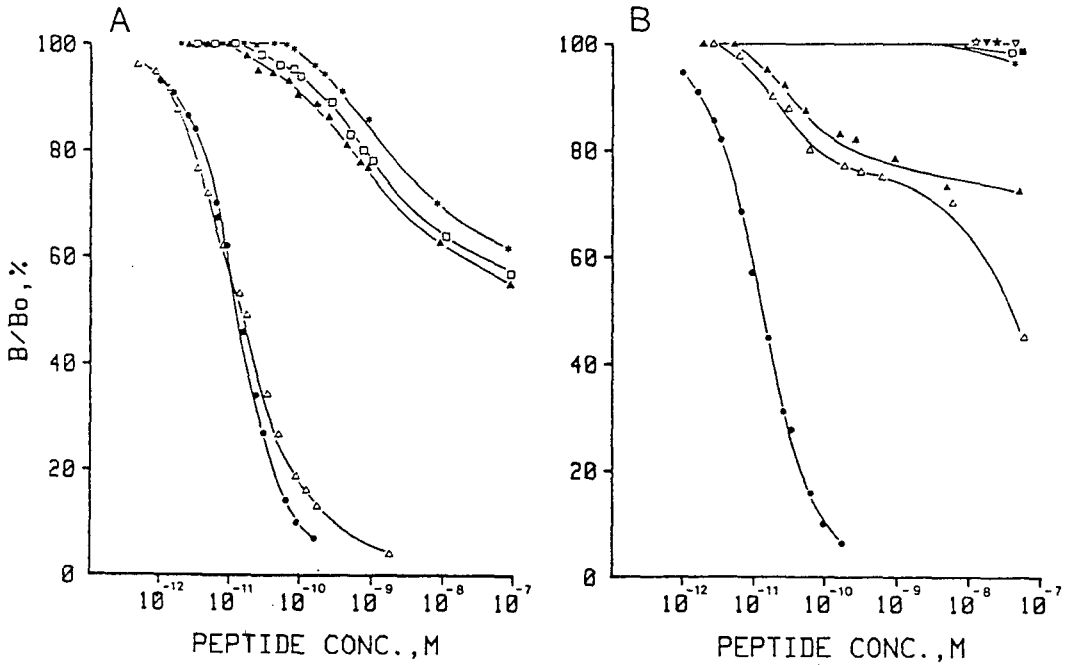


Fig. 2. Cross-reactivity of gastrin antibody. Extent of the cross reactivity was expressed as tracer binding ratio at various peptide concentrations comparing with that of zero concentration (B_0). The curves represent the displacement of the following peptides. A) ●, G-17-I; △, human big gastrin; ▲, pentagastrin; □, gastrin related tetrapeptide; *, [β -benzyl-Asp⁴]-pentagastrin B) ●, G-17-I; △, cholecysto-kinin-8; ▲, caerulein; *, somatostatin; □, neurotensin; ■, substance-P; ☆, bombesin; ▼, motilin; ★, secretin; ▽, vasoactive intestinal polypeptide.

해하는 peptide들의 상대적인 강도를 G-17-I과 비교하여 Table 1에 제시한다. 본 gastrin 항체에 대한 G-17-I의 교차반응성에 비하여 human big gastrin의 교차반응성은 저농도에서 110% 그리고 고농도에서 80%이어서 이들 두가지 peptide가 거의 동일하게 gastrin 항체에 반응함을 보여준다. G-17-I과 C-terminal의 amino acid 서열이 같으나 분자의 크기가 훨씬 작은 peptide인 pentagastrin, gastrin related tetrapeptide, [β -benzyl-Asp⁴]-pentagastrin과는 0.1~1%, cholecystokinin과는 3~7%, caerulein과는 1~2%의 교차반응을 나타내었다. 기타 neurotensin, substance-P, somatostatin, bombesin, motilin, secretin, vasoactive polypeptide 등과는 $10^{-8}M$ 까지 교차반응을 일으키지 않았다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 half saturation concentration ($C_{0.5}$)은 G-17-I가 12.6 pM 그리고 human big gas-

Table 1. Potencies of peptides relative to human gastrin-17-I (=1.000) in inhibiting binding of [¹²⁵I]-gastrin-17-I to gastrin antibody

Peptide	Inhibiting potency
human gastrin-17-I	1.000
human big gastrin-34	0.800~1.100
pentagastrin	0.003~0.010
gastrin related tetrapeptide	0.002~0.007
[β -benzyl-Asp ⁴]-pentagastrin	0.001~0.003
cholecystokinin-8	0.030~0.070
caerulein	0.010~0.020
neurotensin, substance-P somatostatin	<0.00005
bombesin, motilin, secretin vasoactive intestinal polypeptide	0

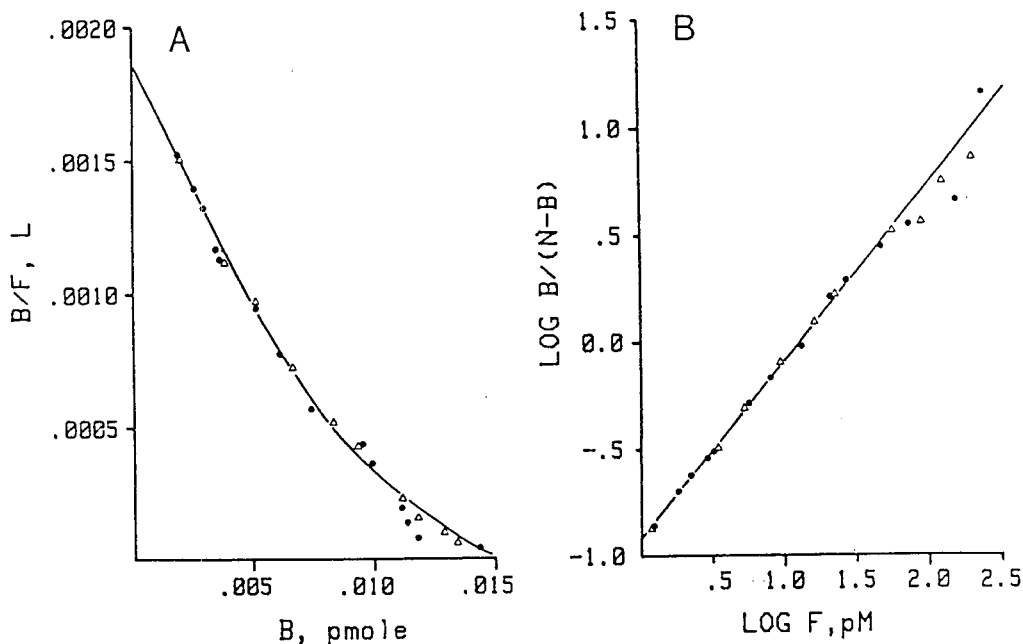


Fig. 3. Scatchard plot (A) and Sips plot (B) of labeled and unlabeled G-17-I to gastrin antibody. The experimental method was described in Methods. Filled circles represent data of titration with ^{125}I -G-17-I while open triangles represent those with unlabeled G-17-I.

trin이 14.1 pM인 것에 비하여, 본 gastrin 항체에 비교적 높은 교차반응성을 나타내는 cholecystokinin-8의 $C_{0.5}$ 는 35.5 nM로 G-17-I의 값에 비하여 2,800배 높았다.

2) gastrin 항체의 친화력 및 이질성 : Scatchard 식에서 B/F와 B를 변수로하여 얻은 Scatchard plot는 완만한 곡선을 나타내었으며 (Fig. 3-A) 이 곡선의 초기경사도 (initial slope)로부터 계산된 effective affinity constant (K_{eff})는 $1.77 \times 10^{11}/\text{M}$ 로 이 값은 매우 낮은 혈장 gastrin 농도를 측정하고자 할 때 필요로 하는 값인 $1.00 \times 10^{11}/\text{M}$ (Rehfeld et al, 1972) 보다 높았다. 본 gastrin 항체의 총결합부위 (total binding sites, N)는 255 nM이며 이 값들로부터 얻은 Sips plot (Fig. 3-B)에서 계산한 이질성지수 (heterogeneity index, α)는 0.84 그리고 average affinity constant는 $0.79 \times 10^{11}/\text{M}$ 이었다.

3. 사람과 흰쥐의 혈장 gastrin 농도

정상인과 위암환자에서 얻은 혈장 gastrin 농도를 Fig. 4에 제시한다. 정상인의 평균 혈장 gastrin 농도

는 공복시에 $55.15 \pm 10.35 \text{ pg/ml}$ 이었으며 hamburger와 우유를 섭취한 15분 후에 최고치인 $142.26 \pm 45.95 \text{ pg/ml}$ 로 유의하게 ($p < .001$) 상승하였다. 유문부암 환자와 체부암 환자에서도 공복시에 각각 56.39 ± 12.42 그리고 $89.34 \pm 25.01 \text{ pg/ml}$ 이었으나 식후 최고치인 103.48 ± 49.30 그리고 $208.20 \pm 83.91 \text{ pg/ml}$ 로 각각 유의하게 ($p < .05$) 상승하였다. 공복시 평균 혈장 gastrin 농도는 정상인에 비하여 유문부암 환자에서는 이렇다할 차가 없었으나 체부암 환자에서는 유의하게 ($p < .05$) 높았다. 식후 15분에 관찰된 최고치의 평균 혈장 gastrin 농도가 정상인에 비하여 유문부암환자에서는 유의하게 낮았으나 ($p < .5$) 체부암환자에서 유의하게 ($p < .05$) 높았다.

흰쥐에서 공복시의 평균 혈장 gastrin 농도는 $36.61 \pm 11.31 \text{ pg/ml}$ 이었으며 식후에 $99.25 \pm 15.70 \text{ pg/ml}$ 로 유의하게 ($p < .001$) 상승하였다. 또한 공복시의 흰쥐에게 합성 bombesin을 $0.5 \mu\text{g/kg}$ 씩 경정맥으로 투여하면 평균 혈장 gastrin 농도가 $42.70 \pm 20.39 \text{ pg/ml}$ 에서 부터 $108.72 \pm 39.92 \text{ pg/ml}$ 로 유의하게 ($p < .001$) 상승하였다 (Fig. 5).

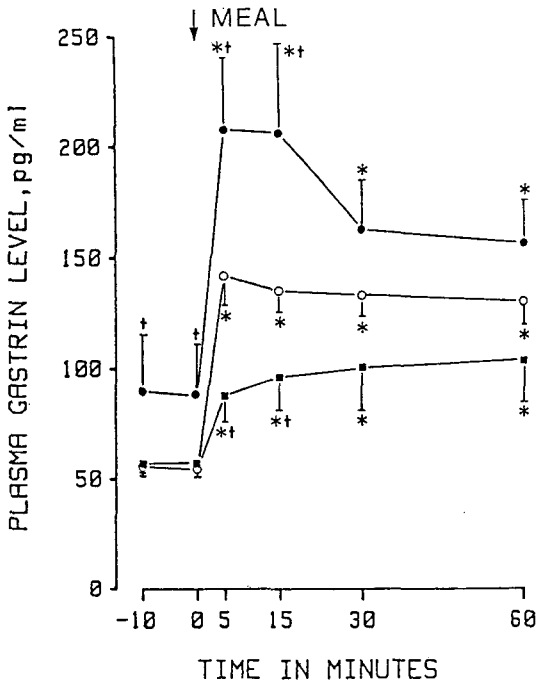


Fig. 4. The mean plasma gastrin concentrations in normal human subjects (○) and subjects with stomach cancer mass in the corpus (●) or antrum (■). Asterisks indicate the value is significantly different from that of the fasting state. Crosses mean the value is significantly different from the corresponding value of the control subject. Each point and bar represent mean \pm SE.

고 찰

본 실험에서 New Zealand white 계의 토끼로부터 얻은 gastrin 항체의 역가는 1:25,000으로 이미 보고된 gastrin 항체 (Rehfeld et al., 1972; Dockray & Taylor, 1976; Tai & Chey, 1976)의 역가에 비하여 다소 낮은 편이나 gastrin 이외의 peptide와 교차반응이 매우 낮게 나타나며 effective affinity constant가 높은 점으로 보아 gastrin의 연구에 적합한 항체라고 생각된다. 본 실험에서 얻은 gastrin 항체가 human big gastrin과 매우 높은 교차 반응을 (80~110%)을 나타내는 반면에 gastrin의 C-terminal에 존재하는 4개의 amino acid residue만으로 구성

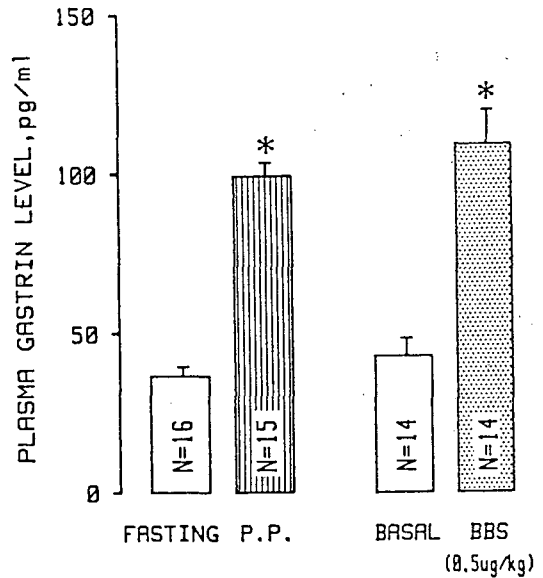


Fig. 5. The mean plasma gastrin concentrations in anesthetized rats. Asterisks indicate the value is significantly different from that of fasting state or basal state. P.P. means postprandial state while BBS means administration of bombesin in a concentration of 0.5 μ g/kg. Each bar represents mean \pm SE.

된 gastrin related tetrapeptide와 0.2~0.7%의 교차반응을 그리고 5개의 amino acid residue만으로 구성된 pentagastrin과는 0.3~1%의 낮은 교차반응을 나타내었다. 한편 C-terminal의 amino acid residue 중 6개가 gastrin과 동일한 cholecystokinin-8과 3~7%의 교차반응을 나타내어 pentagastrin에 비하여 높은 교차반응을 나타내었다. 이러한 결과들로 미루어보아 C-terminal의 amino acid residue 중에서 gastrin과 공유하는 amino acid residue의 수가 많은 peptide일수록 본 gastrin 항체와 높은 교차반응을 나타내는 것으로 생각된다.

Scatchard plot에서 곡선형의 성격을 보이는 것은 본 gastrin 항체가 어느정도 이질적인 친화력을 지니고 있음을 시사할 뿐만 아니라 Sips plot와 Sips의 식에서 얻은 이질성지수가 0.84인 것으로 보아 본 gastrin 항체가 하나의 affinity constant를 지니고 있다고 생각하기는 어렵다. 대부분의 항체는 한 종류 이상의 affinity constant를 지니고 있다고 보고되어

있다(Berson & Yallow, 1959). affinity constant 중 Scatchard plot의 초기경사도(initial slope)로 부터 구한 effective affinity constant가 방사면역측정에서 측정한계(detection limit)를 반영하는 요소로 알려져 있다(Ekins, 1970). 본 gastrin 항체의 effective affinity constant는 $1.77 \times 10^{11}/M$ 로 낮은 생리적농도의 혈장 gastrin 농도를 측정하는데 필요로하는 것으로 알려진 값인 $1.00 \times 10^{11}/M$ (Rehfeld et al., 1972) 보다 높으므로 본 gastrin 항체는 생리적상황에서 gastrin의 농도를 측정하는데 충분한 정도의 친화력을 지니고 있는 것으로 생각된다.

본 실험에서 lactoperoxidase를 촉매로하고 H_2O_2 를 산화제로 사용하여 제조한 ^{125}I -gastrin의 특수방사능은 $1,215 \mu Ci/nmole$ 로 chloramine-T를 산화제로 사용하여 제조한 것의 값에(약 $600 \mu Ci/nmole$: Rehfeld, 1980) 비하여 상당히 높아 lactoperoxidase를 사용하는 방법이 chloramine-T를 사용하는 방법보다 더 효과적임을 알 수 있다. 또한 본 실험에서 제조된 ^{125}I -gastrin의 면역성함량은 81.2% 이었는데 이 값은 Rehfeld et al. (1972)가 보고한 값인 89.6%에 비하여 큰 차가 없다. Scatchard plot와 Sips plot에서 standard gastrin과 ^{125}I -gastrin의 graph가 동일한 선상에 위치하는 것으로 보아 이들 두 물질은 본 gastrin 항체에 대하여 동등한 친화력을 지니고 있는 것으로 생각된다.

방사면역측정의 민감성을 결정하는 요소로는 항체의 effective affinity constant 그리고 표지된 peptide의 특수방사능과 면역성 함량 외에도 incubation 부피, preincubation 유무, incubation 기간등이 관여하는 것으로 알려져 있다(Rodbard & Ruder, 1971). 그러므로 본 실험에서는 방사면역측정의 민감성을 높이기 위하여 24시간의 preincubation 과 72시간의 postincubation을 실시하였다.

본 실험에서 얻은 정상인의 공복시 평균 혈장 gastrin 농도는 $55.15 \pm 10.35 pg/ml$ 로 Walsh(1973)가 주장하는 정상인의 측정치 범주에 포함된다. 공복시와 식후에서 체부암 환자의 혈장 gastrin 농도가 정상인의 해당값에 비하여 유의하게 높은 본 실험의 결과는 Park et al (1987)의 보고와 잘 일치한다. 또한 흰쥐에게 bombesin을 투여하면 혈장 gastrin 농도가 상승하는 본 실험의 결과도 Bertaccini et al

(1974)그리고 Walsh et al (1979)의 보고와 일치한다. 이러한 결과들로 보아 본 실험에서 생산한 항 gastrin 혈청은 생리적상황에서 gastrin의 농도를 측정하는데 적합한 gastrin 항체를 지니고 있는 것으로 생각된다.

요 약

New Zealand white 계의 토끼에게 EDC를 사용하여 hemocyanin에 접합시킨 human G-17-I을 면역한 결과 gastrin의 방사면역측정에 적합한 항 gastrin 혈청을 얻는데 성공하였다. 본 실험에서 얻은 항 gastrin 혈청의 역가는 1:25,000이며 human G-17-I 과 human big gastrin에 매우 친화력이 높은 반면 다른 위장관 peptide 들과는 교차반응성이 아주 낮았다. 본 항 gastrin 혈청의 effective affinity constant는 $1.77 \times 10^{11}/M$ 이었다. 또한 총 결합부위(total binding sites)는 255 nM, 이질성지수(heterogeneity index)는 0.84 그리고 average affinity constant는 $0.79 \times 10^{11}/M$ 이었다. 본 실험에서 얻은 항 gastrin 혈청을 사용하여 사람과 흰쥐의 혈장 gastrin 농도를 방사면역측정법으로 측정된 결과 이미 잘 알려진 결과와 동일한 성적을 얻을 수 있었다. 이러한 결과들을 종합하여 볼때 본 실험에서 얻은 항 gastrin 혈청은 생리적농도로 존재하는 gastrin의 방사면역측정에 적합한 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Berson SA & Yallow RS (1959). Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. *J Clin Invest* 38, 1996
- Bertaccini V, Erspamer V, Melchiorri P & Soprani N (1974). Gastrin release by bombesin in the dog. *Br J Pharmac* 52, 219-225
- Boehm M, Lee Y, Chey WY (1974). Radioimmunoassay of secretin, I. Production of secretin antibodies and development of the radioimmunoassay, In: Chey, WY & Brooks F (ed) *Endocrinology of the gut*. Charles B Slack Publication, Thorofare, New Jersey, p 310-319
- Chang, TM & Chey WY (1980). Radioimmunoassay of

- secretin, A critical review and current status. *Dig Dis Sci* 25, 529-552
- Dockray GJ & Walsh JH (1975). Amino terminal gastrin fragment in serum of Zollinger-Ellison syndrome patients. *Gastroenterology* 68, 222-230
- Dockray GJ & Taylor IL (1976). Heptadecapeptide gastrin: measurement in blood by specific radioimmunoassay. *Gastroenterology* 71, 971-977
- Edkins JS (1905). On the chemical mechanism of gastric secretion. *Proc R Soc (London) [Biol]* 76, 376
- Eisen HN & Siskind GW (1964). Variations in affinities of antibodies during the immune response. *Biochemistry* 3, 996
- Ekins R & Newman B (1970). Theoretical aspects of saturation analysis. *Acta Endocrinol* 147, 11-36
- Ekins RP (1971). Mathematical treatment of data and automation. In: Kirkham KE & Hunter WH(ed) *Radioimmunoassay methods*, Churchill Livingstone, Edinburgh and London, p 614-615
- Ghatei MA, Jung RT & Stevenson JC (1982). Bombesin: Action on gut hormones and calcium in man. *J Clin Endocrinol* 55, 103-107
- Rodbard D, Rider HJ, Vaitikaitis J & Jacobs HS (1971). Mathematical analysis of kinetics of radioligand assay: improved sensitivity obtained by delayed addition of labeled ligand. *J Clin Endocrinol* 33, 343
- Rosenquist G & Walsh J (1980). Radioimmunoassay of gastrin. In: Glass GBJ(ed) *Gastrointestinal hormones*, vol 33, Raven Press, New York, p 759-795
- Scatchard G (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51, 660-672
- Sips P (1948). On the structure of a catalyst surface. *J Chem Phys* 15, 490-495
- Stadil F & Rehfeld JF (1972). Preparation of ¹²⁵I-labeled synthetic human gastrin-I for radioimmunoanalysis. *Scand J Clin Lab Invest* 30, 361-368
- Tai HH & Chey WY (1976). Simultaneous radioimmunoassay of secretin and gastrin. *Anal Biochem* 74, 12-24
- Walsh JH (1973). Interpretation of serum gastrin values. In: Sleisenger, MH & Fordtran JS(ed) *Gastrointestinal disease: pathophysiology-diagnosis-management*, WB Saunders, Philadelphia, p 555-559
- Walsh JH, Wong, HC & Dockray GJ (1979). Bombesin-like peptides in mammals. *Fed Proc* 38, 2315-2319
- Walsh JH (1987). Gastrointestinal hormone. In : Johnson LR, Christiansen J, Jackson J, Jacobson ED & Walsh JH(ed) *Physiology of the gastrointestinal tract*, Raven press, New York, p 182-195
- Yallow RS & Berson SA (1970). Radioimmunoassay of gastrin. *Gastroenterology* 58, 1-14
- Endocrinol Metab* 54, 980-985
- Goodfriend TL, Levine L & Fasman GD (1964). Antibodies to bradykinin and angiotensin: A use of carbodiimides in immunology. *Science* 144, 1344-1346
- Haber E, Richards FF & Page LB (1967). Modifications in the heterogeneity of the antibody response. In : Frisch L & Cairns J(ed) *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, Vol 32, Cold Spring Harbor, New York, p 299-310
- Hansky J & Cain MD (1969). Radioimmunoassay of gastrin in human serum. *Lancet* 2, 1388-1390
- Hurn BAL & Landon J (1971). Antisera for radioimmunoassay. In: Kirkham KE & Hunter WM(ed) *Radioimmunoassay methods*, Churchill Livingstone, Edinburgh and London p 121-142
- Karush F (1962). Immunologic specificity and molecular structure, *Adv Immunol* 2, 1-40
- Klotz IM & Hunston DL (1971). Properties of graphical representation of multiple classes of binding sites. *Biochemistry* 10, 3065-3069
- McGuigan JE & Trudeau WL (1970). Studies with antibodies to gastrin: radioimmunoassay in human serum and physiological studies. *Gastroenterology* 58, 139-150
- McGuigan JE & Trudeau WL (1973). Serum and tissue gastrin concentration in patients with carcinoma of the stomach. *Gastroenterology* 64, 22-25
- Park HJ, Kwon HY, Lee YL, Kim YK & Kim KM (1987). Plasma gastrin concentration, gastrin content in antral mucosa and acid output in normal subjects and patients with gastric cancer. *Human Sci* 11, 359-366 (in Korea)
- Pauwels S & Dockray G (1982). Identification of NH₂-terminal fragments of big gastrin in plasma. *Gastroenterology* 82, 56-61
- Rehfeld JF, Stadil F & Rubin B (1972). Production and evaluation of antibodies for the radioimmunoassay of gastrin. *Scand J Clin Lab Invest* 30, 221-232
- Rehfeld JF (1980). NH₂-terminal monoiodination of

hexadecapeptide gastrin: a simple procedure for preparation of ^{125}I -gastrin for radioimmunoassays and receptor studies. *Clin Chim Acta* 101, 271-275
Rehfeld JF & Morley J (1983). Residue specific radioim-

munoanalysis: a novel analytical tool, application to the C-terminus of CCK/gastrin peptides. *J Biochem Biophys Meth* 7, 161-170