

抗透明帶 抗體의 特性에 關한 研究
I . 間接酵素免疫分析法과 間接免疫螢光分析法에 의한
抗透明帶 抗體의 確認

金恩永 · 劉永春 · 朴世必 · 鄭炯敏 · 鄭吉生 · 金鐘培

建國大學校 畜產大學

Studies on the Characteristics of Anti-Zona Antibody
I . Identification of Anti-Zona Antibody by Indirect ELISA and
Indirect Immunofluorescence Test

Kim, E.Y., Y.C. Yoo, S.P. Park, H.M. Chung, K.S. Chung and J.B. Kim
College of Animal Husbandry, Kon-Kuk University

SUMMARY

These experiments were undertaken as a basic study to develop immunocontraceptive vaccine and to understand the role of zona pellucidae in early fertilization process by identifying the monoclonal and polyclonal antibody to porcine zona pellucidae and polyclonal antibody to mouse zona pellucidae by indirect ELISA and indirect immunofluorescence test.

The results obtained in these experiments were summarized as follows :

1. The titer of the antibodies to zona was determined by indirect ELISA using solubilized porcine zona coated plates. Both monoclonal and rabbit polyclonal antibodies showed very high titers: O.D at 1 : 12,800 dilution of antibodies was still significantly higher than that of non-immunized control serum. Rabbit anti-mouse zona pellucidae sera also reacted with porcine zona pellucidae.
2. By indirect immunofluorescence test strong fluorescences were observed on the egg treated with homologous and heterologous rabbit polyclonal antibodies and FITC labelled 2nd antibodies and found to crossreact strongly with the eggs from the pig and mouse. While weakened fluorescences were observed on the eggs treated with monoclonal antibodies.

I . 緒 論

哺乳動物의 卵子는 透明帶로 둘러싸여 있으며 여기에는 種特異的 精子受容體가 存在하여 受精初期 段階에 精子는 이 透明帶에 結合한 다음(Hartman 등, 1972; Hartman과 Huchison, 1976) 자체 蛋白分解 酵素로서 透明帶를 通過하여 卵子의 原形質膜과 融合하게 된다(Stambaugh와 Bukly, 1969; Polakowski

등, 1972).

受精後 透明帶는 透明帶反應의 機轉에 의해 多精子侵入을 防止하며(Austin과 Braden, 1956; Yanagimachi, 1972) 受精卵의 發達에 適切한 環境을 提供하고 卵管에서의 受精卵移動에 奇與한다(Austin, 1982).

이러한 透明帶의 機能에 關한 研究 結果에 基礎하여 透明帶에 대한 관심이 증가된 것은 透明帶가 免疫避妊 vaccine 으로의 利用 可能性-透明帶에 대해 製作된 抗

體는 *in vitro* 에서 精子結合을 遮斷할 수 있으며 (Tsunoda 와 Chang, 1976a) *in vivo* 에서는 受精을 抑制시킬 수 있다(Gwatkin 등, 1980) -이 提示되고 있기 때문이다(Sacco, 1981 와 Dunbar, 1983).

最近에는 human 과 돼지의 透明帶가 免疫學的으로 類似性を 지니고 있다는 것이 밝혀져 (Shivers 와 Dunbar, 1977) 특히 돼지 透明帶에 대한 研究가 활발히 進行되고 있다.

이에 本 研究에서는 精子受容體 構造細明을 위한 基礎研究로서 돼지 透明帶에 대한 單-클론抗體와 複合抗體 및 생쥐透明帶에 대한 複合抗體를 生産하여 間接酵素免疫分析法과 間接免疫螢光分析法으로 抗體의 力價 및 特異性を 調査코자 實施하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試材料

(1) 培養液

돼지의 경우 卵子處理用 基礎培養液으로는 TCM 199 (Gibco, CAT NO.400-1100)에 Na-Pyruvate 0.11g/l, Gentamycin 0.2mg/ml을 添加한 것을 使用하였으며, 卵巢로부터 卵胞卵을 回收할 때에는 25mM HEPES-TCM 199을 使用하였다. 卵胞卵의 體外成熟을 誘導하기 위해서는 基礎培養液에 여러가지를 添加했는데 添加한 호르몬은 1 μ g/ml의 FSH, 2IU/ml의 hCG, 1 μ g/ml의 Oestradiol-17 β 이었으며 이외에도 10% fetal calf serum(FCS)을 添加하였다.

생쥐의 경우 未受精卵의 回收와 培養液에는 T6培養液(Whittingham, 1982)을 使用하였다.

이들 모든 培養液의 pH는 TCM 199의 경우 7.2~7.4, T6의 경우 7.8, 滲透壓은 公히 285~290 mOsmol/kg으로 調整하여 使用하였으며 使用직전에 0.2 μ m의 membrane filter(German Science Inc., USA)를 使用하여 除菌한 다음 10ml씩 分注하여 4°C에서 保管하면서 使用하였다.

(2) 卵胞卵의 回收

卵巢를 屠殺直後에 切取하여 100 IU/ml의 Penicillin G와 100 μ g/ml의 Streptomycin sulfate를 含有한 38~39°C의 生理的 食鹽水가 들어있는 保溫瓶으로 옮겨 2시간 이내 實驗室까지 운반하였다. 이어 20 gauge의 注射針이 附着된 10ml注射器를 使用하여 3~5mm의 可視卵胞卵을 回收하였다.

(3) 透明帶의 回收와 溶液化

上記의 方法에 의해 운반된 卵巢로부터 돼지透明帶를 回收할 目的으로 Bonnie S. Dunbar(1980)의 sieving 技法을 利用하였다. 이 方法에 의해 回收된 卵子는 washing buffer(130mM NaCl Soln. (pH 7.0) 0.01 M Sodium phosphate, 2mM EDTA, 11mM Sodium citrate, 0.1% PVP)로 洗滌한 후 卵子의 直徑보다 가는 micropipette(100 μ m)으로 卵子를 강하게 吸引함으로써 透明帶를 分離, 回收하였다. 回收된 透明帶는 washing buffer로 4~5회 洗滌한 후 免疫原으로 使用할 경우 0.05 M PBS(pH 7.0)에 浸漬하여 73°C 20분간 處理함으로써 溶液化(solubilization)하였다(Sacco, 1983).

(4) 多排卵誘起

供試動物로는 年齡 4~6週齡, 體重 20~25g의 ICR 系統의 雌性생쥐를 使用하였으며 5IU의 PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin; Intervet, Holland)와 hCG(Human Chorionic Gonadotropin; Sigma, USA)를 48시간 間隔으로 各 各 腹腔에 注射함으로써 多排卵을 誘起하였다.

(5) 抗透明帶 抗體

1) 돼지透明帶에 대한 單-클론抗體

돼지透明帶를 免疫시킨 BALB/C mouse와 Myeloma cell: SP2/0-Ag 14을 融合하여 製作된 (유 등, 1989)것을 使用하였다. 한편, 역가가 제일 높은 3E84E7(YI)을 (NH₄)₂SO₄ 沈澱法(Garvey 등, 1977)과 Sepharose CL-4B Protein A affinity column(Ey, 1978)에 의해 精製한 후 供試하였다.

2) 생쥐透明帶에 대한 複合抗體

本 實驗室에서 製作된(서 등, 1987)것을 使用하였다.

2. 試驗方法

(1) 抗透明帶抗體 生産

Primary injection을 위한 免疫原으로 5,000개의 돼지 透明帶가 含有된 PBS buffer와 Freund's Complete Adjuvant(Sigma, USA)를, booster injection으로는 Freund's Incomplete Adjuvant를 各各 1:1(v/v)로 混合하여 2週 間격으로 3회에 걸쳐 雄性토끼에 皮內注射한 후 test bleeding을 實施하여 間接酵素免疫分析法으로 抗透明帶抗體 存在를 確認하였으며, 最終 booster 注射 후 6日째에 採血하여

Table 1. Summary of the conditions for the production of antisera to mouse and porcine zona antigens.

| Antigen | Solubilization procedure | Animal immunized | Total protein | | Antibody | Abbreviation |
|-------------------------------|--|------------------|----------------------------------|---------|------------------------------------|--------------|
| | | | Primary | booster | | |
| Heat solubilized porcine zona | 0.05M PBS (pH 7.0) 73°C 20min. | Rabbit | 5,000 (150 μ g) ^a | 3 times | Rabbit anti-porcine zona pellucida | RAPZP |
| Heat solubilized porcine zona | 0.05M Na ₂ CO ₃ (pH 9.6) 65°C 90min. | Mouse | 300 (9 μ g) ^{a'} | 3 times | Mouse anti-porcine zona pellucida | MAPZP |
| Heat solubilized mouse zona | 0.05M Na ₂ CO ₃ (pH 9.6) 65°C 90min. | Rabbit | 900 (27 μ g) ^b | 6 times | Rabbit anti-mouse zona pellucida | RAMZP |

a, a' porcine zona protein content : 30 ng/porcine zona

b mouse zona protein content : 3 ng/mouse zona

4°C에서 overnight로 定置시킨 후 2,500 rpm에서 30분간 遠心分離하여 抗血清을 分離하였고 사용직전까지 -20°C에서 保管하였다. 對照血清으로는 抗體生産을 實施하기 이전의 同一한 토끼에서 採血하여 同一한 方法으로 血清을 分離하였다.

한편, 이외에 本 實驗에 사용된 여러 種類의 抗透明帶抗體 生産을 위한 Immunization 過程을 要約하면 Table 1과 같다.

(2) 間接酵素免疫分析法(Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ; ELISA)

溶液化된 돼지 卵子透明帶를 100 ng/ml의 濃度로 하여 polystyrene microtiter plate의 各 well에 分注하여 4°C에서 overnight coating시킨 후 3% BSA-PBS로 35°C에서 1시간 blocking 하였다.

이어 抗血清과 對照血清을 1 : 100~1 : 12,800까지 double dilution하여 2시간동안 반응시킨 후 rabbit serum의 경우에는 Goat anti-Rabbit IgG HRP를 1 : 500으로, mouse serum의 경우엔 Goat anti-Mouse IgG HRP를 1 : 200으로 稀釋시켜서 2시간 동안 반응시켰다.

또한 0.05% H₂O₂ (v/v)와 0.04% O-phenylene diamine(w/v)을 含有한 0.15M Citrate phosphate buffer를 30분간 반응시켜 490 nm에서 ELISA

Reader (Dynatech, USA)로 O.D 價를 測定하였다.

(3) 間接免疫螢光分析法(Indirect Immunofluorescence : IF)

돼지 卵子와 생쥐 卵子 공히 抗血清과 對照血清이 0.3~10%까지 各各 含有되어 있는 培養液 小滴에서 30분간 培養한 後 新鮮한 培養液으로 5회 洗滌하였다. Rabbit serum의 경우에는 Goat anti-Rabbit IgG-FITC가 40 : 1로, mouse serum의 경우에는 Goat anti-Mouse IgG-FITC가 60 : 1로 稀釋된 배양액 소적으로 옮겨 30분간 室溫에서 追加로 배양하였다. 이어 5회 洗滌한 후 이들 卵子를 slide glass 중앙으로 옮겨 cover slip으로 덮은 다음 螢光顯微鏡(Leitz, West Germany)하에서 形態學的인 特性을 觀察하였다.

III. 結果 및 考察

1. 間接酵素免疫分析法(Indirect ELISA)에 의한 여러 抗體의 力價調查

抗原인 돼지 透明帶(Fig.1)溶液을 coating한 後 各 各의 抗血清과 對照血清을 1 : 100에서 1 : 12,800으로 희석하여 各 well에 分注하여 反應시킨 다음 ELISA Reader로 490 nm에서 O.D 價를 測定한 結

Table 2. Titration of anti-zona sera by indirect ELISA.

| Sample | Serum dilution | | | | | | | |
|--------|----------------|-------|-------|-------|---------|---------|---------|----------|
| | × 100 | × 200 | × 400 | × 800 | × 1,600 | × 3,200 | × 6,400 | × 12,800 |
| A | over | over | over | over | over | over | over | 1.42 |
| B | over | over | over | over | over | over | over | over |
| C | over | over | over | over | over | 1.30 | 0.81 | 0.28 |
| D | over | over | over | over | 1.31 | 0.88 | 0.47 | 0.34 |
| E | 1.08 | 1.25 | 1.34 | 1.29 | 1.35 | 0.95 | 0.85 | 1.07 |
| F | 1.19 | 1.24 | 1.29 | 1.28 | 1.31 | 1.24 | 1.20 | 1.17 |
| G | 0.62 | 0.45 | 0.38 | 0.31 | 0.19 | 0.14 | 0.10 | 0.02 |
| H | 0.69 | 0.46 | 0.36 | 0.33 | 0.24 | 0.15 | 0.08 | 0.01 |

A - B : RAPZP (Rabbit anti-porcine zona pellucida)

C - D : MAPZP (Mouse anti-porcine zona pellucida)

E - F : RAMZP (Rabbit anti-mouse zona pellucida)

G - H : Control serum



Fig. 1. Isolated porcine zona pellucidae (× 40)

果는 Table 2에서 보는 바와 같았다.

Table 2에서 보는 바와 같이 對照血清 G-H에서 O.D價는 處理區인 A-F에서의 O.D價와 比較해 볼 때 顯著하게 낮았으며, 處理區인 A-F의 결과에서 각

各의 抗體를 比較해 볼 때 돼지透明帶에 대한 複合抗體는(A-B)그 反應度가 높아서 1 : 12,800의 희석농도에서도 over의 O.D價를 나타내어 抗透明帶抗體가 생성되었음을 확인할 수 있었으며 돼지透明帶에 대한 單一클론항체의 경우(C-D) 1 : 3,200의 희석농도에서 1.30, 0.88의 O.D가를 얻었지만 그 이후의 희석농도에서는 점차적으로 낮아져서 1 : 12,800의 희석농도에서는 0.28, 0.34로 複合抗體(A-B, E-F) 各各의 O.D가 보다 현저히 낮음을 알 수 있었다.

또한 생쥐透明帶에 대한 複合抗體를 사용하여 돼지透明帶와의 交叉反應性を 檢討한 결과 交叉反應性이 존재함을 알 수 있었다.

2. 間接免疫螢光分析法(Indirect Immunofluorescence)에 의한 透明帶抗體의 反應性

돼지卵子和 생쥐卵자를 抗血清과 對照血清이 各各 0.3~10% 含有되어 있는 培養液에서 배양한 후 rabbit血清의 경우 FITC-Goat anti-Rabbit IgG, mouse血清의 경우 FITC-Goat anti-Mouse IgG를 含有한 培養液에서 추가배양을 실시하여 螢光顯微鏡하에서 觀察하였을때의 결과는 Table 3에서 보는 바와 같았다.

對照血清을 處理한 돼지卵자와 생쥐卵자의 모든 群에서는 螢光이 觀察되지 않았던 반면, 돼지卵자의 경우 돼지透明帶에 대한 複合抗體가 돼지卵자의 透明帶에서 매우 강한 螢光을 나타냈으며 1.2%의 血清濃度에서

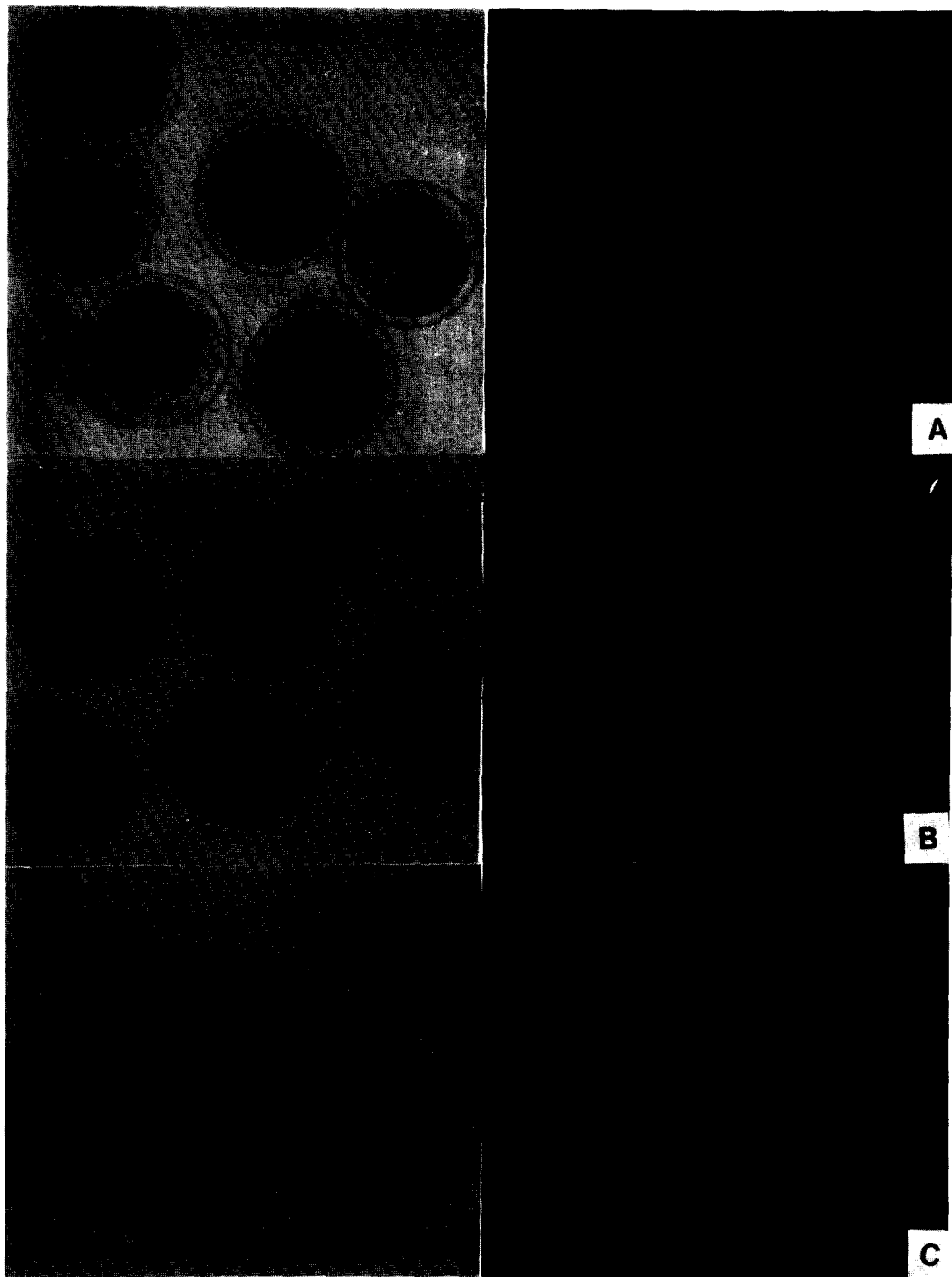


Fig. 2. Porcine eggs treated with FITC-Goat anti-Rabbit(A,C) and Mouse(B) IgG following incubation RAPZP(A), MAPZP(B) and RAMZP(C), respectively($\times 200$)

Table 3. Detection of fluorescence on porcine and mouse eggs treated with anti-zona serum

| Antibodies Antigen Con- centration (%) ^{a)} | RAPZP | | MAPZP | | RAMZP | | CONTROL | |
|---|--------------------|------|-------|------|-------|------|---------|------|
| | porc. | mou. | porc. | mou. | porc. | mou. | porc. | mou. |
| 10 | ++++ ^{b)} | +++ | ++~+ | + | +++ | ++++ | - | - |
| 5 | ++++ | ++ | + | + | ++ | ++++ | - | - |
| 2.5 | ++++ | ++ | + | + | ++ | ++++ | - | - |
| 1.2 | +++ | + | + | + | + | +++ | - | - |
| 0.6 | ++ | + | + | - | + | ++ | - | - |
| 0.3 | + | + | + | - | + | + | - | - |
| Control | - | - | - | - | - | - | - | - |

a) Concentration of anti-zona serum (%)

b) Intensity of Immunofluorescent formed on surface of zona :

++++, very strong; +++, strong; ++, moderate; +, weak; -, negative

강한 螢光을 觀察할 수 있었다(Fig. 2.A).

또한 돼지透明帶에 對한 單一클론抗體는 10%의 血清濃度에서 弱한 螢光이 존재함을 확인할 수 있었다(Fig. 2.B). 그러나 생쥐透明帶에 대한 複合抗體도 돼지透明帶에서 強한 螢光(Fig. 2.c)을 얻을 수 있었는데, 이러한 결과는 ELISA에서 얻어진 결과와 함께 考察하여 볼 때 생쥐透明帶에 대한 複合항체와 돼지透明帶사이에는 交叉反應性이 존재함을 확인시켜 주는 것이라고 하겠다.

한편, 생쥐卵자의 경우 생쥐透明帶에 대한 複合抗體가 생쥐난자의 透明帶에서 매우 強한 螢光을 나타냈으며 1.2%의 血清濃度에서도 強한 螢光을 관찰할 수 있었다.

또한 돼지透明帶에 대한 複合抗體에서도 強한 螢光을 나타냈는데 이러한 결과는 돼지卵자에 생쥐透明帶에 대한 複合抗體를 처리한 대조적인 실험에서 얻어진 內容과 동일한 결과로서 돼지透明帶에 대한 複合抗體와 생쥐透明帶에서도 역시 交叉反應性이 존재함을 확인시켜 주는 것으로서 Sacco(1981)등이 보고한 內容과 一致되는 것이었다. 그러나 돼지透明帶에 대한 單一클론抗體는 그 反應性이 약하거나 대조혈청에서와 같이 螢光現象을 관찰할 수 없었다.

IV. 摘要

本 試驗은 免疫避妊 vaccine의 開發과 透明帶의 精子受容體 構造糾明을 위한 基礎研究로서 돼지透明帶에 대한 單一클론抗體와 複合抗體 및 생쥐透明帶에 대한 複合抗體의 利用可能性을 檢討해 보고자 間接酵素免疫分析法과 間接免疫螢光分析法을 實施하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 透明帶를 抗原으로 하여 間接酵素免疫分析法을 實施하였을때 單一클론抗體와 複合抗體들은 1 : 12,800의 稀釋濃度에서도 매우 높은 O.D價를 얻어 對照血清과 比較해 볼 때 有意한 差異를 나타냈으며 생쥐透明帶에 대한 複合抗體도 돼지透明帶와 反應性이 있음을 確認할 수 있었다.
2. 돼지 및 생쥐卵자에 同質 또는 異質의 複合抗體를 處理하여 FITC-2nd 抗體가 含有된 培養液내에서 培養한 후 螢光顯微鏡下에서 觀察하였을때 強한 螢光이 나타났으며 또한 種間의 交叉反應性도 確認할 수 있었다. 한편, 單一클론抗體에서는 弱한 螢光을 觀察할 수 있었다.

V. 引用文獻

1. Austin, C.R. 1982. Germ cells and fertiliza-

- tion. In reproduction in mammals. pp. 46-62. Eds. Austin, C.R. and R.V. Short. Cambridge University Press, Cambridge.
2. Dakhno, F.V., T. Hjort and V.I. Grischenko. 1980. Evaluation of immunofluorescence on pig zona pellucida for detection of anti-zona antibodies in human sera. *J.Reprod. Immunol.*, 20: 281-291.
 3. Dunbar, B.S. and C.A. Shivers. 1976. Immunological aspects of sperm receptors on the zona pellucida of mammalian eggs. In *Immunology of Receptors*. B. Cinader, New York: Marcel Dekker, pp. 509-519.
 4. Dunbar, B.S., N.J. Wardrip and J.L. Hedrick. 1980. Isolation, physicochemical properties and the macromolecular composition of the zona pellucida from porcine oocytes. *Biochemistry* 19: 356-365.
 5. Dunbar, B.S. 1983. Antibodies to zona pellucida antigens and their role in fertility, chap. 23. In: *Immunology of Reproduction* (T. Wegmann and T. Gill, eds.). Oxford University Press, New York pp. 505-534.
 6. Dunbar, B.S. and D.S. Bundman. 1987. Evidence for a role of the major glyco-protein in the structural maintenance of the pig zona pellucida. *J. Reprod. Fert.*, 81: 363-376.
 7. Greve, J.M. and P.M. Wassarman. 1985. Mouse egg extracellular coat is a matrix of interconnected filaments possessing a structural repeat. *J. Mol. Biol.*, 181: 253-264.
 8. Gwatkin, R.B.L. and D.T. Williams. 1976. Receptor activity of the solubilized hamster and mouse zona pellucida before and after the zona reaction. *J.Reprod. Fert.*, 49: 55-59.
 9. Gwatkin, R.B.L. and D.T. Williams. 1978
 - b. Immunization of female rabbits with heat-solubilized bovine zona: Production of anti-zona antibody and inhibition of fertility. *Gamete Res.*, 1: 19-26.
 10. Gwatkin, R.B.L., O.F. Anderson and D. T. Williams. 1980. Large scale isolation of bovine and pig zonae pellucidae; Chemical, immunological, and receptor properties. *Gamete Res.* 3: 217-231.
 11. Hartman, J.F., R.B.L. Gwatkin and G.F. Hutchison. 1972. Early contact interactions between mammalian gametes *in-vitro*; Evidence that the vitellus influences adherence between sperm and zona pellucida. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69, 2767-2769.
 12. Hartman, J.F. and G.F. Hutchison. 1976. Nature of the prepenetration contact interaction between hamster gametes *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 36, 49-57.
 13. Mori, T., T. nishimoto, M.Kitagawa, Y. Noda, T. Nishimura and T.Oikawa. 1978. Possible presence of autoantibodies to zona pellucida in infertile women. *Experientia*, 34: 797-799.
 14. Nishimoto, T., T.Mori, I.Yamada and T. Nishimura. 1980. Autoantibodies to zona pellucida in infertile and aged women. *Fertil. Steril.*, 34: 552-556.
 15. Polakowski, K.L., L.J.D. Zaneveld. & W.L. Williams. 1972. *Biol. Reprod.* 6, 23-29.
 16. Sacco, A. G. and V. S. Palm. 1977. Heteroimmunization with isolated pig zona pellucida. *J. Reprod. Fert.*, 51: 165-168.
 17. Sacco, A. G. 1978. Immunological specificity of anti-zona binding to zona pellucida. *J. Exp. Zoology*, 204: 181-186.
 18. Sacco, A.G. 1981. Immunocontraception: Consideration of the zona pellucida as a target antigen. In *Obsterics and Gynecology Annual*, Vol. 10, pp.1-26 Ed. R.H. Wynn. Appleton-Century-Crofts, New York.
 19. Sacco, A.G., E.C. Yurewicz and M.G. Subramanian. 1983. Isolation and preliminary characterization of a purified pig zona antigen (PPZA) from porcine oocytes. *Biol.*

- Reprod., 29 : 511-523.
20. Sacco, A.G., E.C. Yurewicz and M.G. Subramanian. 1986. Carbohydrate influences the immunogenic and antigenic characteristics of the ZP III macromolecule (Mr 55,000) of the pig zona pellucida. J. Reprod. Fert., 76 : 575-586.
 21. Shivers, C.A. and B.S. Dunbar. 1977. Autoantibodies to zona pellucida: A possible cause for infertility in woman. Science 178 : 1211-1213.
 22. Stambaugh, R., J. Buckley. 1969. J. Reprod. Fert. 8. 423-432.
 23. Tsunoda, Y and M.C. Chang. 1976. Effect of anti-rat ovary antiserum on the fertilization of the mouse and hamster eggs *in vitro*. Biol. Reprod. 14 : 354-361.
 24. Tsunoda, Y. and T. Sugie and J. Mori. 1976. Quantitative determination of titers of anti-zona antiserum. J. Esp. Zoology, 207 : 315-320.
 25. 서광영. 1987. Studies on the production of antibody to mouse zona pellucida and its effect on the fertilization of mouse effects. 건국대학교 대학원 석사학위 청구논문.
 26. 유영춘. 1989. Studies on the production of monoclonal antibody to porcine zona pellucida and its characterization. 건국대학교 대학원 석사학위 청구논문.
 27. 박세필, 박태균, 윤산현, 고대환, 정길생. 1989. Studies on *in vitro* maturation of bovine follicular oocytes; III. *In vitro* fertilization and development of *in vitro* matured bovine follicular oocytes. 한축지 13(2) : 105-112.