韓國家畜繁殖學會誌 14(2) : 125~131(1990)
Korean J.Animal Reprod.

抗透明帶 抗體의 特性에 關한 硏究
III. 돼지透明帶와 抗透明帶 抗體의 生化學的 特性 檢討

金恩永・朴世必・申亨淳*・鄭吉生・金鍾培
建國大學校 畜産大學

Studies on the Characteristics of Anti-Zona Antibody
III. Examination of Biochemical Characteristics of Porcine Zona Pellucidae and Anti-Zona Antibody

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

SUMMARY

These experiments were carried out to investigate of the molecular characteristics of porcine zona pellucidae and to examine the reactivity of anti-zona antibody by SDS-PAGE, Immunoblotting and Immunoprecipitation.

The results obtained in these experiments were summarized as follows:

1. The result obtained by SDS-PAGE of porcine zona pellucidae indicated that it composed of several units with molecular weight ranging 55,000-110,000.
2. In order to see the reactivity of antibodies to zona pellucidas, immunoblotting was applied. The results indicated that polyclonal antibodies to porcine and mouse zona reacted with porcine zona. While monoclonal antibody to porcine did not react with the procine zona enough to show a clear band on a gel.
3. Labelling of porcine zonae with ^{125}I was performed using the Iodogen method, the radioactivity and the percent incorporation of ^{125}I into porcine zonae were approximately 26,000 cpm/10μl and 16, respectively.
4. Measurements of radioactivity and O.D value for Immunoprecipitates produced by reaction of ^{125}I-porcine zona with anti-zona antisera were confirmed that existence of reactivity of monoclonal antibody to porcine zona although its reactivity was lower than that of polyclonal antibodies, and reconfirmed that cross-reactivity of polyclonal antibody of mouse zona with porcine zona.

I. 緖 論

透明帶는 哺乳動物의 卵子를 둘러싸고 있는 糖蛋白 Extracellular matrix로 여기에는 種特異的 精子受容體가 存在하여 Species-specific fertilization이 이루어지게 하는 것으로 알려져 있다(Gwatkin과 Williams, 1976, 1978b).

그러나 透明帶에 대해 製作된 抗體는 精子의 結合 혹

*綠十字 綜合硏究所(Korea Green Cross Crop. Research Laboratory)

은 浸透를 防害하거나 體內에서 正常的인 卵胞發育을 變形시킴으로써 受精을 抑制시킬 수 있으며(Dunbar와 Wolgemuth, 1984; Skinner등, 1984) 他種의 透明帶와 交叉反應(cross-reaction)한다고 보고되고 있다(Sacco등, 1981a; Sacco, 1978; Shivers등, 1978).

分子造成面에서 볼 때 透明帶는 哺乳類의 種에 따라 多樣하여 3~5개의 主要糖蛋白으로 이루어져 있으며, 2-Dim. PAGE 分析에서 나타난 電荷(charge)와 分子量(MW)의 廣範圍한 heterogeneity는 posttranslational modification에 의한 것이라고 보고되고 있다(Dunbar등, 1981).

特히 돼지透明帶는 明確한 heterologous glycoprotein 즉, 82,000(ZP I), 61,000(ZP II) 55,000(ZP III) 및 21,000(ZP IV) (Subramanian, Yurewicz와 Sacco, 1981; Hedrick과 Wardrip, 1981)으로 構成되어 있으며, 그중 ZP III는 種特異的 精子受容體로서(Bleil, J.D와 P.M.Wassarman, 1980) 인간에 있어서 避妊 vaccine 開發의 表識抗原으로서 使用 可能性이 示唆되고 있다(Yurewicz, Sacco와 Subramanian, 1983, 1985; Dunbar와 Raynor, 1980).

本 實驗에서는 SDS-PAGE와 Immunoblotting을 實施하여 돼지透明帶의 分子的 特性을 糾明함과 아울러 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 反應性을 確認하기 위하여 Immunoprecipitation을 實施하여 다소의 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 供試材料

1) 돼지透明帶의 回收

透明帶를 回收할 目的으로 Bonnie S.Dunbar (1980)의 sieving 技法을 利用하였는데 그 方法을 간단히 소개하면, 屠殺場에서 入手한 卵巢를 -20℃ 냉동에 보관하였다가 使用時, PBS buffer[10mM Sodium phosphate, 2mM EDTA, 11mM Sodium citrate, 0.1% PVP, 130mM NaCl(pH 7.0)]에 浸漬하여 卵胞를 터뜨린 다음 mesh(297, 149, 74μm)를 이용하여 sieving 함으로써 最終的으로 74μm에 걸러진 卵子 혹은 透明帶를 PBS buffer로 洗滌한 후 卵子의 直徑보다 가는 micropipette(100μm)으로 卵子를 강하게 吸引함으로써 透明帶를 分離 回收하였다.

2) 抗透明帶抗體

(1) 돼지透明帶에 대한 複合抗體

4~5個月齡의 Japanese Giant種의 雄性토끼를 使用하여 製作된(김등, 1990)것을 이용하였다.

(2) 돼지透明帶에 대한 單一클론抗體

돼지透明帶를 免疫시킨 BALB/C mouse와 Myeloma cell; SP2/0-Ag14을 融合하여 製作된(유등, 1987)것을 사용하였다. 한편, 역가가 제일 높은 3E84 E7(YI)을 $(NH_4)_2SO_4$沈澱法[Garvey등(1977)]과 Sepharose CL-4B Protein A affinity column(Ey. 1978)에 의해 精製한 후 供試하였다.

(3) 생쥐透明帶에 대한 複合抗體

本 實驗室에서 製作된(서 등, 1978)것을 사용하였다.

2. 試驗方法

1) One-Dimesional SDS-PAGE

抗體製作에 사용된 돼지透明帶抗原의 純度 確認 및 分子量 測定을 위한 電氣泳動은 Laemmi法(1970)에 따라 實施하였다.

回收된 透明帶는 2ml microfuge tube에 모아 遠心分離(9,000×g)하여 pellet화한 후, Sample buffer [0.5M Tris-HCl(pH 6.8), Glycerol, 10% SDS, 2% mercaptoethanol, 0.05% BPB]에 넣어 (30,000 zonae/400μl) 95℃ 5분간 熱處理하였다. 이어 Sample(50μg)을 stacking gel의 well에 apply함으로써(3% acrylamide including bisacrylamide cross linker) 透明帶 構成分子들을 Slab gel에서 分離시켰으며(8% acrylamide including bisacrylamide cross linher), Coosmassie Brilliant Blue-R로 染色하였다.

2) Immunoblotting

돼지透明帶에 대한 抗透明帶抗體의 生成有無를 確認함과 아울러 생쥐透明帶와의 交叉反應(croos-reaction)을 檢討하기 위하여 Western blotting法을 사용하였다.

1-Dim. SDS-PAGE를 實施한 후 gel을 染色 固定시키지 않은 상태로 nitrocellulose paper의 陰極에 놓아 Electroblot transfer unit(Hoefer Scientific Inc.)에서 30volt로 overnight transfer시켰고, 이

어 NC-paper는 3% BSA-PBS로 1시간동안 blocking하여 0.05% Tween 20/PBS로 1회 세척하였다.

돼지透明帶에 대한 複合抗體와 單一클론抗體 및 생쥐 透明帶에 대한 複合抗體를 各各 1%BSA-PBS로 稀釋하여 NC-transfer와 2시간이상 反應시켰으며 3回 洗滌한 후, 複合抗體는 Goat anti-Rabbit IgG HRP를 單一클론抗體는 Goat anti-Mouse IgG HRP를 各各 1 : 500으로 희석하여 2시간이상 反應시켰다. 이어 3회 세척한 다음 基質을 添加하여 反應結果를 發色시켰으며 反應停止를 위해 3.7% formaldehyde-PBS를 첨가함으로써 抗體反應有無를 判定하였다.

3) Porcine zonae의 Radioiodination

돼지透明帶에 대한 ^{125}I labelling은 Iodogen方法을 이용하였다.

Iodogen(Pierce Chemicals, USA)을 tube에 coating(10μg/tube)시킨 후 PBS로 洗滌하고 용액화되어 있는 돼지透明帶(15μg/80μl)와 NaI^{125}(NEN England)를 가하여 (2mCi/20μl) 30분간 反應시켰으며 1M KI용액 400μl을 첨가하여 반응을 停止시켰다. 이어 PD-10 column(Pharmacia, Sweden)에 PBS용액과 함께 apply하여 溶出시킨 다음 10μl을 취하여 γ-counter(PACKARD, USA)로 cpm을 測定하였다.

4) Immunoprecipitation

^{125}I로 labelling되어 있는 돼지透明帶 용액에 各各의 抗血淸을 가하여 4℃에서 overnight로 反應시킨 후 各各 Protein A-Sepharose 4B Column(Pierce Chemicals, USA)에 옮겨 overnight로 반응시켜 cpm이 background 상태로 될때까지 washing한 다음, 3M Guanidine-HCl로 溶出시켜 radioactivity와 protein 含量을 γ-counter와 Spectrophotometer에서 각각 測定하였다.

III. 結果 및 考察

1. SDS-PAGE를 이용한 돼지透明帶의 分子量 測定

돼지透明帶抗原의 純度 確認 및 分子量 測定을 위한 전기영동 결과는 Fig. 1에서 나타난 바와 같다.

Lane 2에서 나타난 돼지透明帶의 分子量 範圍는 80,000部分이 擴散된 55,000~110,000사이에서 band

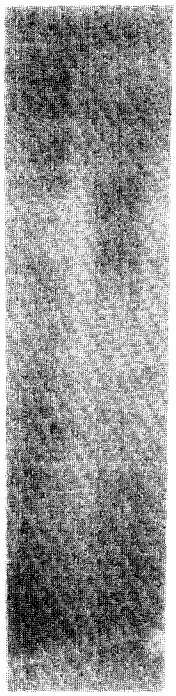

Fig. 1. One-dimensional SDS-PAGE of porcine zonae pellucidae(ZP) glycoproteins.
Prior to electrophoresis, reduced samples were prepared by heating in buffer containing 2% mercaptoethanol.
Electrophoresis was conducted at 60mA for 4 hr and migrations were toward the anode (bottom).
1) Protein standards-molecular weight($\times 10^{-3}$) are indicated to the left.
2) Reduced porcine zona glycoproteins(50 μg).

가 形成됨을 알 수 있었다. 이러한 結果는 돼지透明帶가 分子量 50,000~80,000(Dunbar 등, 1981) 48,000~76,000(Sacco, 1983)으로 構成되어 있으며, 2-Dim. PAGE에서 55,000~60,000, 65,000~70,000, 90,000~92,000에 이르는 分子量을 보인다(Subramanian, Yurewicz와 Sacco, 1981 ; Sacco, Yurewicz, Subramanian과 Demayo, 1981 ; Dunbar, Liu와 Sammons, 1981 ; Hedrick과 Wardrip, 1981)는 報告를 參照해 볼 때 類似한 結果를 얻었다고 하겠다.

2. Immunoblotting에 의한 透明帶와 透明帶抗體의 反應程度

抗透明帶抗體의 生成有無確認 및 생쥐透明帶抗體와의 交叉反應性을 檢討하기 위하여 實施한 Western blotting結果는 Fig. 2에서 보는 바와 같았다.

Fig. 2에서 나타난 바와 같이 돼지 및 생쥐透明帶에 대한 複合抗體(A, C) 및 精製된 생쥐透明帶에 대한 複合抗體(B)는 抗原으로 이용되었던 돼지透明帶와 反應시켰을 때 band가 형성되었는데, 이러한 結果는 抗體의 生成 및 생쥐透明帶에 대한 複合抗體와의 交叉反應性을 確認시켜 주는 것이라 하겠다.

한편 돼지透明帶에 대한 정제된 單一클론抗體(D), 腹水(E) 및 培養上層液(F)을 反應시킨 結果, band가 형성되지 않아 抗體의 存在를 確認할 수 없었다. 이러한 結果를 綜合하여 考察하여 볼 때 앞서 實施했던 Immunofluorescence와 PPT에서 얻어진 結果를 確認시켜 주는 것으로 思料된다.

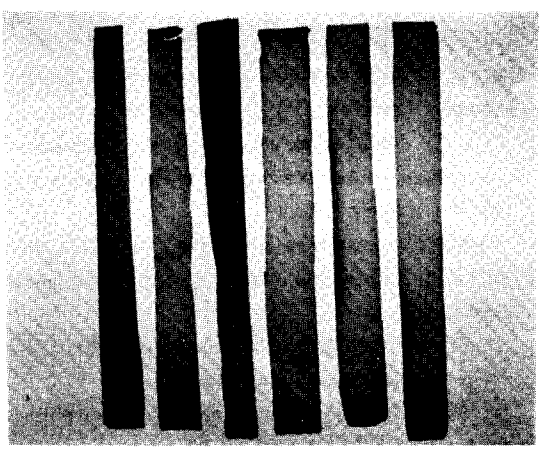

Fig. 2. Immunoblot patterns of porcine zona proteins.
Approximately 1,600 zonae were applied per well.
A; Incubated with RAPZP.
B, C; Incubated with purified RAMZP & RAMZP respectively
D, E, F; Incubated with purified antibody, ascitic fluid & supernatant of monoclonal line(3E84 E7), respectively

3. Radioiodination of porcine zonae

Iodogen method를 이용한 돼지透明帶의 ^{125}I labelling은 PD-10 column에서 받아낸 3.5ml중 10 μl의 radioactivity를 측정하여 대략 26,000cpm과 16%의 incorporation rate를 얻었다.

4. Immunoprecipitation

^{125}I-Porcine zona와 各各의 抗血淸 反應結果生成된 Immunoprecipitates의 radioactivity와 O.D value를 調査하였을 때의 結果는 Fig. 3에 나타낸 바와 같다.

Fig. 3. A에 나타낸 各各의 抗血淸에 대한 抗原-抗體 反應性은 複合抗體(●-●, × ×)가 單一클론抗體(▲ ▲) 보다 높은 radioactivity를 나타냈다. 이러한 結果는 複合抗體의 多價結合(multivalent binding)에 의한 結合活性(avidity)增加때문인 것으로 思料된다.

또한 돼지透明帶에 대한 單一클론抗體(▲-▲, 3E84 E7, Subtype; IgG 2a)의 radioactivity는 돼지透明帶에 대한 複合抗體의 그것보다는 낮게 나타났지만, 반응성이 存在함을 確認시켜 주는 것으로서 앞서 實施했던 ELISA, PPT, IF, IVF, Immunoblotting의 結果들과 綜合하여 考察해 볼 때 抗原-抗體 反應性은 존재하나 抗體의 역가가 낮다는 것을 재차 뒷받침해 주는 結果라 思料된다. 한편 생쥐透明帶에 대한 複合抗體(× ×)는 돼지透明帶와의 交叉反應性이 있음을 確認할 수 있었다.

그리고 Fig. 3. B의 O.D.價는 A의 radioactivity fraction과 類似한 curve를 얻을 수 있었다.

IV. 摘 要

本 實驗은 돼지透明帶의 分子的 特性을 糾明함과 아울러 抗透明抗體의 反應性을 檢討하기 위하여 SDS-PAGE, Immunobloting과 Immunoprecipitation을 實施하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 돼지透明帶를 SDS-PAGE를 이용하여 分析한 결과 55,000에서 110,000사이의 分子量을 갖는 여러개의 unit로 構成되어 있었다.

2. Immunoblotting方法을 이용하여 돼지透明帶에 대한 抗透明帶抗體들의 反應程度를 調査하였던 바 돼지 및 생쥐透明帶에 대한 複合抗體는 돼지透明帶와 반응하

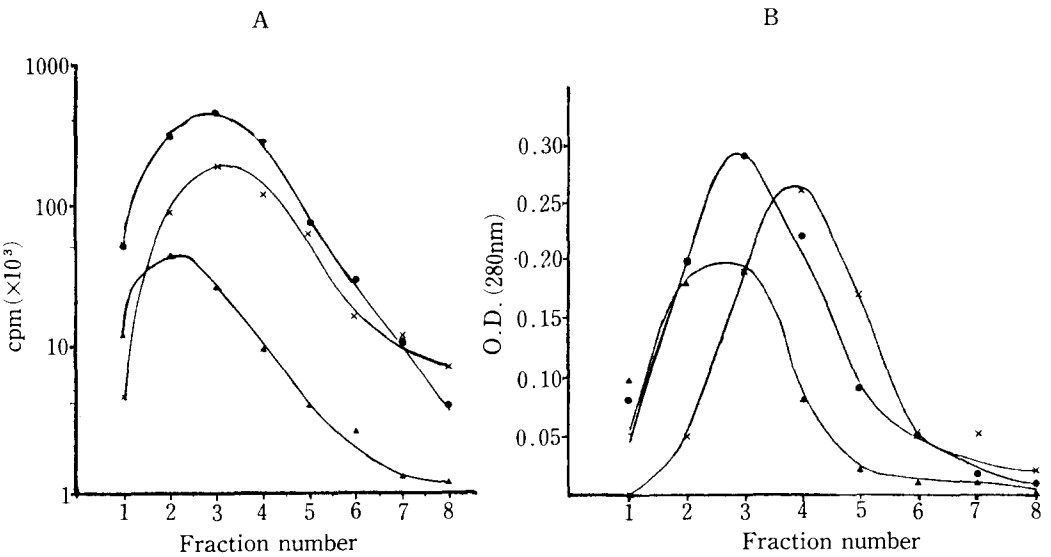

Fig. 3. Elution profile of immunoprecipitates of solubilized ^{125}I-porcine zona proteins with anti-zona antibodies by protein A-Sepgarose CL-4B column eluted with 3.0M Guanidine-HCl buffer.

●-●: RAPZP ×-×: PAMZP ▲-▲: 3E84E7

A) Radioactivity

B) O.D. value of protein

였던 반면 돼지透明帶에 대한 單一클론抗體는 gel 상에 明確한 band를 形成할 정도의 반응은 하지 않았다.

3. 돼지透明帶의 ^{125}I labelling을 Iodogen method를 이용하였으며 그 radioactivity를 測定하였던 바, 대략 26,000cpm과 16%의 incorporation rate를 얻었다.

4. ^{125}I-porcine zona와 各各의 抗血淸 反應結課 生成된 Immunoprecipitates의 radioactivity와 O.D value를 調査하였던 바 돼지透明帶에 대한 單一클론抗體는 複合抗體보다는 낮았지만 그 반응성이 존재함을 確認할 수 있었으며 생쥐透明帶에 대한 複合抗體와 돼지透明帶의 交叉反應性을 재차 確認하였다.

V. 引用文獻

1. Bleil, J.D. and P.M. Wassarman. 1980. Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of mouse oocytes zona pellucida. Dev. Biol., 76: 185-202.
2. Dean, J. and I.J. East. 1984. Monoclonal antibodies as probes of the distribution of ZP-2, the major sulfated glycoprotein of the murine zona pellucida. J. Cell Biology, Vol. 98: 795-800.
3. Drell, D.W. and B.S. Dunbar. 1984. Monoclonal antibodies to rabbit and pig zonae distinguish species-specific and shared antigenic determinants. Biol. Reprod., 30: 445-457.
4. Dunbar, B.S., N.J. Wardrip and J.L. Hedrik. 1980. Isolation, physicochemical properties, and macromolecular composition of zona pellucida from porcine oocytes. Biochemistry, 19: 356-365.
5. Dunbar, B.S., D.D. Raynor. 1980. Charac-

terization of porcine zona pellucida antigens. Biol. Reprod. 22 : 941-54.

6. Dunbar, B.S. and D.M. Wood. 1981. Direct detection of two cross-reactive antigens between porcine and rabbit zonae pellucidae by radioimunoassay and immunoelectrophoresis. J. Exp. Zoology, 217 : 423-433.
7. Dunbar, B.S., C.Liu and D.W. Sammons. 1981. Identification of the three major proteins and rabbit zona pellucida by high resolution two-dimensional gel electrophoresis : Comparison with serum, follicular fluid, and ovarian cell proteins. Biol. Reprod., 24 : 1111-1124.
8. Dunbar, B.S., D, Wolgemuth. 1984. Structure and function of mammalian zona pellucida, a uique extracellular matrix In : Satir B(ed.), Modern Cell Biology 3. New York : Alan R.Liss, pp. 77-111.
9. Dunbar, B.S., T.M. Timmons, G.A. Maresh and D.S. Bundman. 1987. Use of specific monoclonal and polyclonal antibodies to define distinct antigens of the procine zonae pellucidae. Biol. Reprod., 36 : 1275-1287.
10. Florman, H.M. and P.M. Wassarman. 1985. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP III account for its receptor activity. Cell, 41 : 313.
11. Gwatkin. R.B.L. and D.T. Williams. 1976. Receptor acitvity of the solubilized hamster and mouse zona pellucida before and after the zona reaction. J.Reprod. Fertil., 49 : 55-59.
12. 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 inihbition of fertility. Gamete Res., 1 : 19-26.
13. Hedrick, J.L. and N. Wardrip. 1981. Microheterogeneity in the glycoproteins of the zona pellucida is due to the carbohydrate moiety. J.Cell. Biol., 91, 177a, Abstract.
14. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature(London) 227 : 680-685.
15. Palm, V.S., A.G. Sacco, F.N.Syner and M.G. Subramanian. 1979. Tissue specificity of porcine zona pellucida antigen(s) tested by radioimmunoassay. Biol. Reprod., 21 : 709-713.
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., E. C. Yurewicz, M. G. Subramanian and F. J. Demay. 1981. Zona pellucida composition : species cross reactivity and contraceptive potential of anti-serum to a purified pig zona antigen (PPZA). Biol Reprod., 25 : 997-1008.
19. Sacco, A.G., M.G. Subramanian and E.C. Yurewicz. 1981. Specific radioimmunoassay for the detection of a purified porcine zona pellucida antigen(PPZA). Biol. Reprod., 24 : 933-943.
20. 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.
21. Sacco, A.G., E.C. Yurewicz and S. Zhang. 1983. Immunoelectrophoretic analysis of the porcine zona pellucida. J. Reprod. Fert., 68 : 21-23.
22. Sacco, A.G., E.C. Yurewicz and M.G. Subramanian. 1986. Carbohydrate influences the immunologenic and antigenic charcteristics of the ZP III macromolecule(Mr 55,000) of the pig zona pellucida. J. Reprod. Fert.,

76 : 575-586.
23. Skinner, S.M., T.Mills, H.J. Kirchid, B. S. Dunbar. 1984. Immunizaition with zona pellucida proteins results in abnormal follicular differentiation and inhibition of gonadotropin-induced steroid secretion. Endocrinology 115 : 2418-32.