

소의 조기임신진단 kit의 개발 1. Progesterone의 抗體生産 및 抗 BSA抗體의 제거

姜 正 夫·李 孝 宗·崔 尙 龍
慶尙大學校 獸醫科大學
(1991. 2. 1 접수)

A study on production of early pregnancy diagnostic kit in cattle 1. Production of polyclonal antibody to progesterone and removal of anti-bovine serum albumin antisera

Chung-boo Kang, Hyo-jong Lee, Sang-yong Choe
College of veterinary Medicine, Gyeongsang National University
(Received Feb 1, 1991)

Abstract: Most progesterone enzyme immunoassays(EIA) are used liquid phase double-antibody separation. These methods consume considerable time and reagents because of the requirements for several washing and centrifugation steps involving the reactants.

Because of there several problems, we were prompted to develop an effective EIA system by the use of higher titer of progesterone antiserum free of anti-bovine serum albumin antibodies (anti-BSA).

The results obtained were as follows.

1. The antibody of progesterone antiserum was high as 1.5×10^5 .
2. Percent activity bound of progesterone antiserum was about 77 at a dilution to 5×10^3 times.
3. Progesterone antiserum was contained a large amount of anti-BSA antibodies.
4. The anti-BSA was completely absorbed by using of polymerised BSA.
5. The molecular weight of albumin polymer (polymerised BSA) obtained by using 2.5% glutaraldehyde was 5×10^6 .

Key words: Enzyme immunoassay(EIA), progesterone, Polyclonal antibody, anti-BSA antibody

緒 論

혈액중의 progesterone 測定法으로는 Hooker 등¹에 의한 生物學的, Short의 比色², Van der Molen 등³에 의한 gas chromatography, Short 등⁴에 의한 螢光測定法 그리고 Abraham 등⁵에 의한 radioimmunoassay (이하 RIA)가 있으나 RIA는 이중에서 測定感度 및 再現性이 아주 높아 지금도 널리 활용되고 있다.⁶⁻⁸

그러나, RIA에서는 radioisotope를 사용해야 하는 특수성 때문에 특수한 시설과 장소를 요함은 물론 인체의 오염 가능성, 폐기물 처리의 어려움 및 사용하는 radioisotope의 반감기가 너무 길거나 짧은 점 등으로 해서 사용에는 많은 제약과 어려움이 있어 앞서의 radioisotope 대신 酵素를 marker로 이용하는 酵素免疫測定法(enzyme immunoassay, 이하 EIA)이 개발되게 되었다.

EIA에는 液相法^{9,10}과 固相法¹¹등이 있으나 前者의 경우 交叉反應 및 精度에 문제가 있고 前者는 실시가 간편하고 시간단축등의 잇점은 있으나 測定感도가 약간 낮은 점이 있다. 저자들은 종래의 一抗體法의 문제점을 보완한 二抗體法의 확립으로 特異성과 精度가 RIA 보다 높은 안정된 결과를 얻을 수 있다는 사실을 보고 한다 있다.¹²⁻¹³

EIA는 steroid홀몬에 대한 측정¹⁴⁻¹⁷을 계기로 Dray 등⁹에 의해 처음 progesterone 측정이 실시 되었으며 생리기능상의 특징으로 소의 발정감정,¹⁸ 임신 및 번식장애 진단,^{10,19} 분만후 난소기능 회복상태,²⁰ 번식장에서 치료효과의 판정^{21,22}에도 크게 활용 가능해 새로운 분석법의 개발이 매우 절실한 실정에 있다.

본 연구에서는 지금까지 개발 보고^{12,13}한 液相에 의한 酵素免疫測定法을 개량하여 간편하면서도 精度가 높은 固相法에 의한 EIA kit를 개발코져 titer가 높은 progesterone의 抗體 획득 및 측정시 문제가 되는 抗 BSA 抗體의 제거를 실시하였다.

材料 및 方法

표준용액: 조제에 사용한 모든 용기는 증류수 洗淨後 無水 methanol로 처리후 건조시켜 사용시까지 4°C 에 보존하였다.

Progesterone(4-pregnene-3, 20-dione; Sigma社製)을 無水 methanol로 용해시켜 4°C의 恒溫室에서 0, 25, 50, 100, 200, 500 및 1,000pg의 progesterone 절대량으로 조절해 사용하였다.

Progesterone 抗體의 획득: 면역방법, 루어간격, 항체의 분리 및 정제는 姜 등의 방법에 준하였으며 抗體價의 측정은 Fig 1과 같이 하여 실시하였다. 면역방법을 간략히 서술하면 New Zealand white rabbit 3匹(평균체중 1.5kg)에 11 α -hydroxy-progesterone-hemisuccinate-BSA(Sigma)를 항원(1mg/head 社製)으로 하여 Freund의 complete 및 incomplete adjuvant

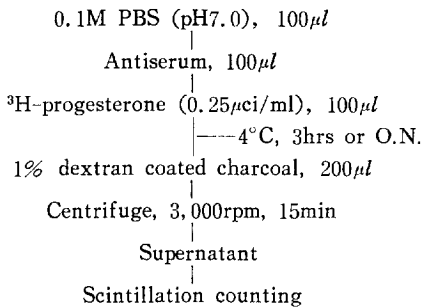


Fig 1. The procedure of RIA to measure the progesterone antibody titer.

로 면역집중하여 作製하였다.

抗 BSA 抗體價의 측정: Progesterone 抗體의 抗 BSA 抗體混入이 예상되어 여기에 대한 측정은 enzyme-linked immunosorbent assay(이하 ELISA)에 의해 Fig 2와 같이 하여 실시하였다.

BSA多量體의 作製: BSA多量體는 Irshad 등²³의 방법에 준해 2.5% glutaraldehyde를 사용해 Fig 3과 같이 실시한 후 Sephadex G-200 column 抽出後 fraction collector(Pharmacia fine chem. Denmark)로 분획해 作製하였다.

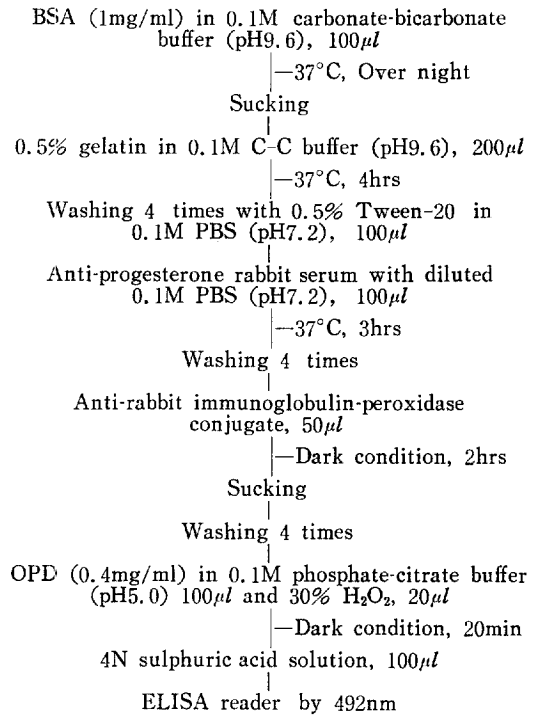


Fig 2. Method of the detection of anti-BSA antibody by ELISA.

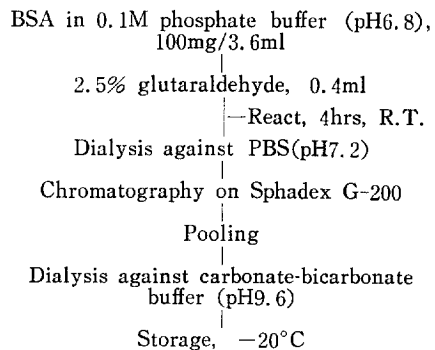


Fig 3. Polymerization of BSA by glutaraldehyde,

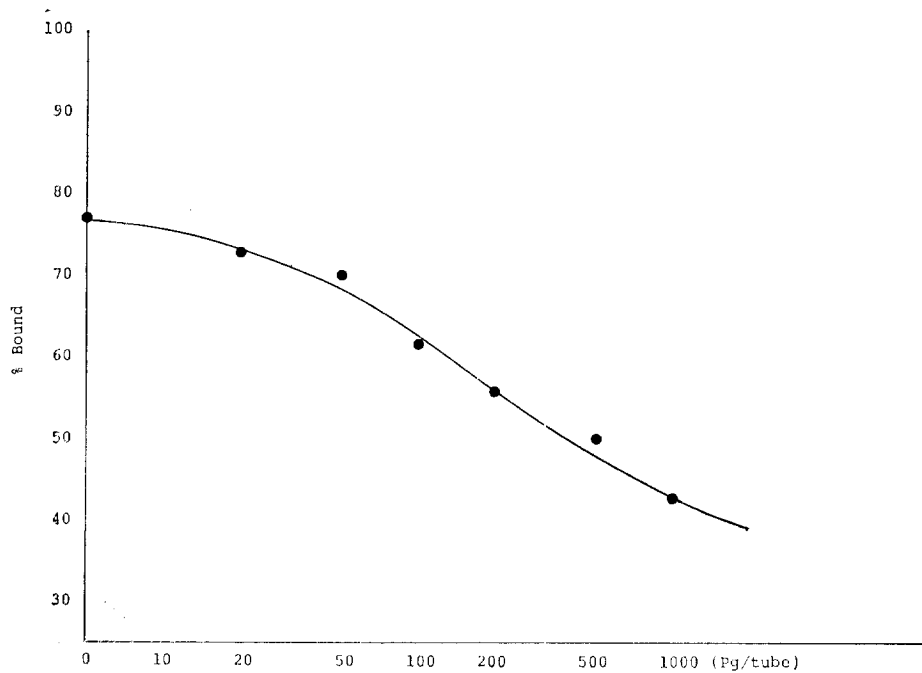


Fig 4. Radioactivity bound to progesterone polyclonal antibody diluted to 5×10^8

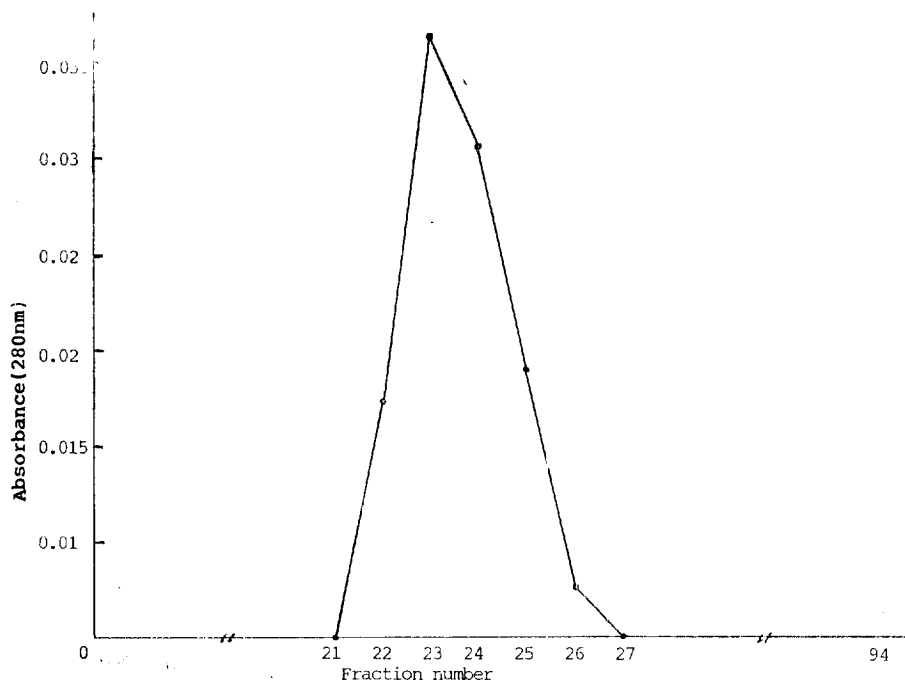


Fig 5. Elution pattern of polymerised BSA in Sephadex G-200 Column. The solution was diluted with PBS, 10 times.

抗BSA抗體의 除去: 抗BSA抗體의 除去는 精製한 progesterone 抗血清을 사용해 BSA多量體로 37°C, 30分間 incubation에 이어 10,000rpm, 20分間 원심분리하여 상층액을 취해 抗BSA抗體의 混在여부를 ELISA로 확인하였다.

結 果

Progesterone의 抗體價: Fig 1과 같이 하여 실시한 progesterone의 항체는 1.5×10^5 이었다. 항원량의 progesterone농도를 0, 20, 50, 100, 200, 500 및 1,000pg/tube로 하여 항원량을 5×10^3 배 희석하여 측정된 결과는 Fig 4와 같이 약 77%의 높은 결합율(B%)을 나타내었고 0pg/tube에서 1,000pg/tube 간에서는 거의 직선적인 감소를 나타내었다(Fig 4).

抗BSA抗體價: Fig 2와 같이 ELISA에 의거 측정된 抗BSA抗體價는 2×10^4 이었다.

BSA多量體의 分割 및 分子量: Fig 3과 같이 2.5% glutaraldehyde를 사용하여 phosphate buffer (pH6.8) 3.6ml에 BSA 100mg의 농도로 하여 作製한 BSA多量體를 fraction collector Frac-100(Pharmacia fine Chem.)으로 分割한 결과는 Fig 5와 같이 No. 22~26 사이이었으나 이 중에서 가장 높은 peak를 나타낸 23, 24의 分割을 pooling하여 BSA多量體로 사용하였다. Irshad등²⁴의 방법에 의한 BSA多量體의 分子量은 5×10^6 이었다.

抗BSA抗體: 측정시의 Fig 2와 같이 하여 BSA多量體에 의한 抗BSA抗體의 混在여부를 ELISA로 측정된 결과 앞서의 항원량에다 BSA多量體로 흡수시킨 후의 상층액에서는 음성(-)이었으나 BSA 농도를 0.1 µg/ml로 하고 BSA多量體(分子量 500,000)를 10^{-6} 배 희석시켜 측정된 결과에서도 명확한 양성(+)반응을 나타내어 BSA多量體에 의해 抗BSA抗體는 완전히 흡수되었음을 알 수 있었다.

考 察

EIA에 의한 progesterone 측정은 Dray등⁹에 의해 처음 실시된 이래 종래의 一抗體法에 의한 液相상태에서의 측정에서는 항원-항체반응이 미약해 測定感도가 낮고 測定內 및 測定間 變動係수가 높아 어려움이 지적되고 있다.^{9,10,12,13}

二抗體法으로 一抗體法을 개선한 液相의 EIA에서는 特異性 뿐만 아니라 精度에서도 一抗體法과는 달리 RIA와 비교해서도 조금도 손색이 없음이 입증되어 가고 있으나 測定系 하나하나의 조건설정이 필요한 난점을 안고 있다.²⁶⁻²⁸

저자들이 보고¹³한 二抗體法에서 測定內와 測定間 變動係수는 각각 4.5%, 9.5%로 RIA와의 성적과도 일치하여 실제 환용에는 아무런 어려움이 없으나 반응시간의 단축, 안정성 및 精度를 더욱 더 높여 나가기 위해서는 종래의 液相化에 의한 분석에서 固相化에 의한 개발이 무엇보다도 절실히 요망되고 있다.

Munro등²⁹은 固相化에 의한 progesterone의 ELISA에서 抗BSA抗體의 존재가 측정에 크게 영향(干渉)을 주고 있음을 밝힌 바 있다.

저자들이 作製한 progesterone의 항원량에도 상당량의 抗BSA抗體가 존재함이 확인되었다. 이에 저자들은 Irshad등²⁴이 보고한 사람의 B형 肝炎의 표면항원(hepatitis B surface antigen; HBsAg)을 BSA多量體로 검출한 것에 기인해 BSA多量體를 作製하여 앞서 作製한 抗血清과 반응시킨 결과 抗BSA抗體를 전혀 混有하지 않음이 입증되어 progesterone ELISA感도 및 特異性を 더욱 더 높여 줄 것으로 기대된다.

더우기 抗血清의 progesterone 抗體價가 매우 높았는데 (1.5×10^5) 이것은 장기간에 걸쳐 실시한 변역점종의 결과로 생각된다.

다른 steroid와의 交叉反應 등에 대한 분석은 실시되지 않고 있어 여기에 대한 보완 역시 필요할 것으로 생각되나 앞서 획득한 항원량은 $5 \times 10^3 \times$ 희석에서도 약 77%의 높은 progesterone 결합율을 나타내어 Progesterone 측정의 ELISA기법의 확립에 크게 기여할 것으로 생각된다.

結 論

종래의 液相(二抗體法 포함)에 의한 progesterone 측정법인 EIA를 개량하여 固相化에 의한 ELISA kit를 개발코저 먼저 progesterone의 抗血清 획득 및 측정시 크게 干渉효과를 가진 것으로 알려진 抗BSA抗體를 제거코저 실시한 결과는 다음과 같았다.

1. Progesterone 항원량의 항체는 1.5×10^5 으로 매우 높았다.
2. Progesterone의 항원량을 $5 \times 10^3 \times$ 희석한 상태에서도 약 77%의 progesterone 결합율을 나타내었다.
3. Progesterone의 항원량내에는 抗BSA抗體 역시 상당량 포함되어 있었으나 BSA多量體로 반응시켜 吸着시킨 결과 완전 흡수(除去)되었다.
4. 作製한 BSA의 分子量은 5×10^6 이었다.

參 考 文 獻

1. Hooker CW, Forbes TR. A bio-assay for minute

- amounts of progesterone. *Endocrinology* 1947; 41:158~163.
2. Short RV. Progesterone in blood. I. The chemical determination of progesterone in peripheral blood. *J Endocrinol* 1958;16:415~425.
 3. Van der Molen HJ, Aakvaag A. Determination of progesterone in human peripheral blood using gas-liquid chromatography with electron capture detection. *J Clin Endocrinol Metab* 1967;25:1625~1629.
 4. Short RV, Levett I. The fluorimetric determination of progesterone in human plasma during pregnancy and the menstrual cycle. *J Endocrinol* 1962;25:239~245.
 5. Abraham GE, Swerdloff R, Tulchisky D, et al. Radioimmunoassay of plasma progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1971;32:619~626.
 6. Bosch AMG, Van Hell H, Brands J, et al. Enzyme-immunoassay for hormones: preparation of tracer: *comparison with radioimmunoassay in immunoenzymatic assay techniques* Ed. R. Malvano Netherlands; M. Nijholl. 1980;1~15.
 7. De Villa GO, Jri Roberts K, Wiest WG, et al. A specific radioimmunoassay of plasma progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1972;35:458~463.
 8. Furuyama S, Nugent CA. A radioimmunoassay for plasma progesterone. *Steroids* 1971;17:663~667.
 9. Dray F, Andrieu JM, Renaud F. Enzyme immunoassay of progesterone at the picogram level using β -galactosidase as label. *Biochemica et Biophysica Acta* 1975;403:131~138.
 10. Nakao T, Sugiyashi A, Ishibashi Y, et al. Use of milk progesterone enzyme immunoassay for early diagnosis in cows. *Theriogenology* 1982; 18:267~274.
 11. Joyce BG, Read GF, Fahmy DR. A specific enzyme immunoassay for progesterone in human plasma. *Steroids* 1977;29:761~770.
 12. 姜正夫, 愼鍾旭, 崔尙龍. Enzyme immunoassay 에 의한 소의 progesterone 측정과 이의 응용에 관한 연구 I. 二抗體의 최적조건에 관한 연구. 大韓獸醫學會誌 1988;28(2):307~310.
 13. 姜正夫, 愼鍾旭, 崔尙龍. Enzyme immunoassay 에 의한 소의 Progesterone 측정과 이의 응용에 관한 연구 II. Progesterone 측정에 대한 酵素免疫測定方法의 확립. 大韓獸醫學會誌 1989;29(1):21~25.
 14. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Quantitation assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971;8: 871~874.
 15. Engvall F, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay. (ELISA). III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J of Immunology* 1972;109:129~135.
 16. Van Weemen BK, Schuurs AHW. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS letters* 1971;15:232~236.
 17. Van Weemen BK, Schuurs AHW. Immunoassay using hapten-enzyme conjugates. *FEBS letters* 1972;24:77~81.
 18. Arnstadt KI, Schmidt-Adamopoulou B. Direct enzyme-immunoassay for determination of progesterone in milk from cows. *Br Vet J* 1982; 138:436~438.
 19. Nakao T, Sugiyashi A, Saga N, et al. Use of milk progesterone enzyme immunoassay for differential diagnosis of follicular cyst and cystic corpus luteum in cows. *Am J Vet Res* 1983;44: 838~890.
 20. 守野繁, 中瀬敏彦, 角田修男 等. 乳汁中プロジェステロン測定による分娩後の 卵巢機能の回復状況の 追跡. 家畜繁殖誌 1984;30:61~67.
 21. Nakao T, Kawata K. Enzyme immunoassay of progesterone in bovine serum and milk its application in monitoring the luteinization of ovarian follicular cyst after hormone treatments. *Proc Int Cong Diseases Cattle*. Tel Aviv 1980; 2:916~933.
 22. Nakao T, Sugiyashi A, Saga N, et al. A further study on the dosage of an analog luteinizing hormone-releasing hormone (fertirelin; Desgly-LH-ethylamide) for treatment of ovarian follicular cyst in cows. *Jpn J Vet Sci* 1983;45: 269~273.
 23. Irshad M, Gandhi BM, Chawla TC, et al. Studies on Hb5 Ag binding with polymerised human

- serum albumin by ELISA. *J virol Meth* 1987; 16:75~85.
24. Irshad M, Khan MY, Salahuddin A. Salting out behaviour of buffalo immunoglobulin G. *Indian J Biochem Biophys* 1981;18:264~268.
 25. Tamamura F, Nakao T, Tsunoda N, et al. An enzyme immunoassay of estrone in swine serum. *Steroids* 1982;39:657~666.
 26. Van Weeman BK, Bosch AMG, Dawson EC, et al. Enzyme immunoassay of hormones. *Scandinavian J Immunol* 1978;7(Suppl):73~82.
 27. Sauer MJA, Cookson AD. Direct enzymeimmunoassay of progesterone in bovine milk. *Steroids* 1981;38:45~53.
 28. Yokota O, Nakao T, Moriyoshi M, et al. Heterologouse enzyme immunoassay of progesterone in serum and from farm animals. *J Coll Dairying* 1985;11(1):141~161.
 29. Munro C, Stabenfeldt G. Development of microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J Endocrin* 1984; 101:41~49.