

Sandwich ELISA 방법을 이용한 생물공학의약품에 잔류하는 숙주유래단백질의 검출법개발

성혜윤 · 최규실 · 김창민 · 민홍기 · 용군호¹

국립보건원, ¹국립보건안전연구원

Determination of Remained Host Derived Proteins in the Commercially Available Biotechnological Products Using a Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay Method

Hye-Youn SUNG, Kyu-Sil CHOI, Chang-Min KIM, Hong-Ki MIN, Kun-Ho YONG¹

National Institute of Health, 5, Nokbun-Dong, Eunpyung-gu, Seoul, Korea

¹National Institute of Safety Research, 5, Nokbun-Dong, Eunpyung-gu, Seoul, Korea

(Received June 24, 1994; accepted July 12, 1994)

Abstract—We obtained the total protein antibodies of *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1720 and *Escherichia coli* K-12 from the rabbit and the guinea pig to determine the host-derived proteins which may be remained in biotechnological products. The protein concentration of rabbit antibodies was 4.05 mg/ml in the case of yeast, 7.14 mg/ml in the case of *E. coli* and that of guinea pig antibodies was 1.90 mg/ml in the case of yeast, 7.17 mg/ml in the case of *E. coli*, respectively. To determine remained host-derived proteins in biotechnological products which produced by the hosts, *S. cerevisiae* or *E. coli*, we used a sandwich enzyme linked immunosorbent assay method in 96 well microplate. When the method applied to determine the remained host-derived proteins in commercial biotechnological products, it detected less than 3.5 ng/vial in human growth hormone, less than 1 ng/vial in hepatitis B vaccine and interferon- γ and 2~23 ng/vial in interferon- α . The method can be used to determine the remained host-derived protein in biotechnological products.

Keywords □ sandwich ELISA, determination of host-derived proteins, *Escherichia coli* K-12, *Saccharomyces cerevisiae*.

최근 물질특허제도의 도입과 생명과학의 급속한 발전으로 국내외에서 새로운 생리활성물질을 찾아 신약으로 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

유전공학기술, 세포융합기술, 단백질공학기술, 미생물 이용기술 등의 생물공학기술의 발달은 그동안 화학합성으로 얻기 어려운 단백질계통의 의약품 등의 생산을 가능케 하였다. 1979년 Genentech사가 췌장의 인슐린을 유전공학기술을 이용하여 *E. coli*에서 생산한 것을 시발로 B형간염 백신, interferon- α , 사람성장호르몬, interferon- γ , 조혈제, colony stimulating factor, tissue plasminogen activator, superoxide dismutase 등이 개발되어 의약품으로 사용되고 있고 epidermal growth factor, recombi-

nant soluble CD4's 등의 유용한 천연생리활성물질들의 개발연구가 계속 진행되고 있다(Mathieu, 1993; Chiu, 1991).

생물공학의약품의 숙주로 초기에는 *E. coli*를 사용했으나 최근에는 yeast나 Chinese Hamster Ovary Cell 등을 사용하여 천연생리활성물질 개발이 활발히 진행되고 있다(Chiu, 1991). 국내에서도 현재 숙주로 *E. coli*, yeast, eukaryotic cell 등을 사용하여 제조된 interferon, B형간염 백신, 사람성장호르몬, 조혈제, colony stimulating factor 등이 시판되고 있다(한국생물산업협회, 1993).

생물공학의약품은 유전자조작에 의하여 대량으로 얻을 수 있는 이점은 있으나, 숙주로 사용한 균주나 세포 등의 단백질이 혼입될 우려가 있다. 의약품에 혼입된 숙주유래단백질은 인체에 주사시 이종단백질로서 인체에 대하

* To whom correspondence should be addressed.

여 항원성을 나타낼 수 있을 뿐만 아니라 역가를 떨어뜨림으로써 분리·정제기술 개발과 함께 간편하고 감도 높은 검출법 개발이 요구된다(Briggs와 Panfill, 1991).

국내에서 상품화되어 사용되고 있는 생물공학의약품들은 대부분이 미국, 일본 및 유럽 등지로 부터 수입된 것과 일부는 국내 개발품으로, 현재는 숙주유래단백질을 검출하기 위하여 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)를 주로 사용하고 있다. 그러나 각 생물공학의약품마다 direct ELISA, indirect ELISA, sandwich ELISA 또는 dot blot method 등 다양한 정량법을 사용하고 있어서 품질관리에 어려움을 주고 있다. 또한 각 생물공학의약품마다 설정하고 있는 잔류 숙주유래단백질의 허용기준치가 서로 달라서 통일된 규제기준이 필요하고 이 기준을 마련하는데 필요한 자료를 얻기위한 통일된 시험법이 절실히 필요하다.

그러므로 본 연구에서는 sandwich ELISA를 이용하여 감도높고 통일된 실험방법을 개발함으로써 생물공학의약품의 품질관리를 철저히 하는데 기여하고자 하였다.

실험방법

Total protein 추출

Yeast로부터 total protein을 추출하기 위하여 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1720 strain을 30°C에서 종배양하여 최종 50 ml의 YPD배지(1% yeast extract, 1% + Bactopeptone, 2% glucose)에서 24시간 진탕배양한 후 원심분리(1,100×g, 15분)하여 균체 침전물을 얻었다. 이 균체 침전물을 disruption buffer(50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0)로 세척한 후 10 ml의 동일 buffer에 현탁하고 이 현탁액에 1/4부피의 glass bead를 넣어 2시간 이상 vortex mixer에서 분쇄하였다. 이렇게 얻은 용액을 다시 원심분리(1,100×g, 15분)하여 침전물을 제거한 후 total protein인 상층액을 취했다. Total protein을 BCA protein assay reagent(Pierce)로 정량한 후 소분하여 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다.

*Escherichia coli*로부터 total protein을 추출하기 위하여 *E. coli* K-12 strain을 50 ml의 LB배지(5 g yeast extract, 10 g Bactotryptone, 10 g NaCl)에서 37°C로 18~24시간 정도 진탕배양한 후 원심분리(1,100×g, 15분)하여 균체 침전물을 얻었다. 이 균체 침전물을 disruption buffer로 세척한 후 동일 buffer 10 ml에 현탁하고 이 현탁액을 ice bath에서 sonication하여 세포를 분쇄하였다. 이 용액을 다시 원심분리(1,100×g, 15분)하여 total protein인 상층액을 취했다. Total protein을 BCA protein assay reagent로 정량한 후 소분하여 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다(Johnstone과 Thorpe, 1987).

Total protein 항체의 분리 및 정제

토끼와 guinea pig에 yeast와 *E. coli* total protein을 각각 주사하여 yeast와 *E. coli* total protein 항체를 확

득하였다.

간단히 기술하면, 토끼에 주사한 total protein 농도는 400 µg/ml가 되게, guinea pig에 주사한 total protein 농도는 100 µg/ml가 되도록 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 희석하였다. 이 희석된 total protein 500 µl와 Freund's complete adjuvant(GIBCO) 500 µl를 Luer fit를 사용하여 잘 현탁시킨 후 토끼의 경우는 대퇴부에, guinea pig의 경우는 피하에 3~4군데 정도 나누어 주사하였다(Catty, 1988). 다시 같은 양의 단백질을 Freund's incomplete adjuvant(GIBCO)에 잘 현탁시킨 후 토끼의 경우에는 2주일, guinea pig의 경우에는 1주일 간격으로 3~4회에 걸쳐 주사하였다. 모든 접종을 끝낸 후 토끼와 guinea pig에서 채혈하였다. 채혈한 혈액을 4°C에서 하룻밤 방치한 후 원심분리(1,100×g, 30분)하여 혈청을 취하였다. 여기에 100% 포화 ammonium sulfate 용액을 천천히 첨가하여 45% 포화 ammonium sulfate 용액을 만든 후 25°C에서 30분간 천천히 저어주었다. 이 용액을 원심분리(1,100×g, 30분)하여 상층액은 버리고 침전물에 초기 혈청과 동량의 phosphate buffer(pH 7.0)를 넣어 녹였다. 동일한 방법으로 40% 포화 ammonium sulfate 용액을 만들어 25°C에서 30분간 천천히 저어준 후, 이 용액을 원심분리(1,100×g, 30분)하여 상층액은 버리고 침전물에 초기 혈청과 동량의 phosphate buffer(pH 7.0)를 넣어 녹인 다음 동일 buffer에서 하룻밤 동안 투석하였다. 투석된 용액을 미리 binding buffer(10 mM Tris-HCl, pH 7.5)로 평형시켜 놓은 Protein A column(Pierce)에 주입시킨 후 binding buffer로 다시 세척하고 분당 1.0 ml 유속의 elution buffer(0.1 M glycine, pH 2.8)로 용출시켰다. Spectrophotometer로 측정하여 280 nm에서 peak를 갖는 분획을 모아 Centricon(cut off 10,000, Amicon)을 이용하여 농축한 후 소분하여 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다(Deutscher, 1990; Harlow와 Lane, 1988).

분리 및 정제한 yeast와 *E. coli* total protein 항체의 purity를 알아보기 위하여 sodium dodecylsulfate(SDS)를 포함한 10% polyacrylamide gel에서 전기영동하여 단백질 band를 확인하였다.

Total protein 항체의 titer 측정

단백질흡착완충용액(0.01 M carbonate buffer, pH 9.6)으로 total protein 농도를 500 ng/ml로 희석하여 96 well microplate에 50 µl씩 분주하고 상온에서 12시간 이상 흡착시켰다. 흡착된 well을 증류수로 3~5회 세척한 후 TBASA(0.01 M Tris-HCl, 0.88% NaCl, 1% bovine serum albumin, pH 7.5)를 60 µl씩 넣어 상온에서 2시간 동안 blocking하였다. 다시 이 well을 증류수로 3~5회 세척한 후 토끼와 guinea pig로부터 얻은 total protein 항체를 각각 적당한 배율로 TTBSA(0.01 M Tris-HCl, 0.88% NaCl, 1% bovine serum albumin, 0.05% Tween 20, pH 7.5)에 단계희석한 후 50 µl씩 분주하여 37°C에서 2시간

반응시켰다. 이때 control로는 TTBSA만 50 μ l씩 넣었다. 각 well을 TTBS(0.01 M Tris-HCl, 0.88% NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5)로 3~5회 세척한 후 토끼의 경우에는 염소로부터 얻은 양고추냉이 퍼옥시다아제가 결합된 항 토끼항체(Boehringer Mannheim)를 1:1,000으로 TTBSA로 희석하고, guinea pig의 경우에는 염소로부터 얻은 양고추냉이 퍼옥시다아제가 결합된 항 guinea pig 항체(Boehringer Mannheim)를 1:50,000으로 TTBSA로 희석하여 50 μ l씩 주입한 후 37°C에서 2시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 각 well을 TTBS로 세척하고, o-Phenylene-diamine dihydrochloride(OPD)용액 50 μ l를 넣어 발색시켰다. 10분간 발색시킨 후 1N 황산을 100 μ l씩 넣어 반응을 정지시키고 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Sandwich ELISA 방법을 이용한 total protein의 정량

Guinea pig로부터 얻은 total protein 항체를 흡착완충용액으로 yeast의 경우에는 1:100, *E. coli*의 경우에는 1:5,000으로 희석하여 96 well microplate에 50 μ l씩 넣고 12시간 이상 상온에서 흡착시켰다. 흡착된 well을 증류수로 3~5회 세척한 후 TBSA를 60 μ l씩 넣어 상온에서 2시간 blocking하였다. 다시 이 well을 증류수로 3~5회 세척한 후 total protein을 TTBSA로 10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 1 ng/ml의 농도로 단계희석한 후 50 μ l씩 넣어 37°C에서 2시간 반응시켰다. 이때 control에는 TTBSA만 300 μ l씩 넣었다. 이 well을 TTBS로 3~5회 세척한 후 토끼로부터 얻은 total protein 항체를 yeast의 경우에는 1:10,000, *E. coli*의 경우에는 1:1,000으로 TTBSA에 희석하여 50 μ l씩 넣어 37°C에서 2시간 반응시켰다. 반응 후 TTBS로 세척하고 염소로부터 얻은 양고추냉이 퍼옥시다아제가 결합된 항 토끼항체를 TTBSA에 1:5,000으로 희석하여 50 μ l씩 주입한 후 37°C에서 2시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 각 well을 TTBS로 세척하고, OPD용액 50 μ l를 넣어 10분간 발색시킨 후 1N 황산 100 μ l를 넣어 반응을

정지시키고 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Sandwich ELISA 방법을 이용한 유전자재조합제품의 잔류 숙주유래단백질 정량

국내에서 시판되는 yeast와 *E. coli*를 숙주로 이용하여 생산한 생물공학의약품을 검체로 하여 숙주유래단백질을 정량하였다. 각 제품을 0.5 ml의 TTBSA로 녹인 후 내용물을 50 μ l씩 취하였으며, 간염백신제품은 현탁액을 원심분리하여 침전물을 얻은 후 이를 0.5 ml의 TTBSA에 현탁시켜 50 μ l를 취하였다. 각 sample 중 잔류하는 숙주유래단백질의 정량은 위에 기술한 sandwich ELISA 방법에 따라 행하였다.

실험결과 및 고찰

Sandwich ELISA 방법을 이용한 total protein의 정량

토끼와 guinea pig로부터 얻은 total protein 항체의 titer를 측정한 결과는 Table I과 같다. 이때 사용한 yeast protein 항체 단백질의 농도는 토끼로부터 얻은 항체가 4.05 mg/ml, guinea pig로부터 얻은 항체가 1.90 mg/ml였으며, *E. coli* protein 항체 단백질의 농도는 토끼로부터 얻은 항체가 7.14 mg/ml, guinea pig로부터 얻은 항체가 7.17 mg/ml였다. Yeast와 *E. coli* protein 항체 모두 guinea pig에 비해 토끼에서 얻은 항체의 titer 값이 높았다. *E. coli* protein 항체는 토끼와 guinea pig에서 얻은 항체

Table I. Titers of rabbit and guinea pig antibodies against total proteins

A. Yeast protein antibody

Rabbit		Guinea pig	
Antibody dilution rate	O.D.	Antibody dilution rate	O.D.
1:10,000	0.348	1:10	0.761
1:1,000,000	0.034	1:100	0.032

B. *E. coli* protein antibody

Rabbit		Guinea pig	
Antibody dilution rate	O.D.	Antibody dilution rate	O.D.
1:10,000	1.870	1:1,000	0.656
1:100,000	0.165	1:10,000	0.178

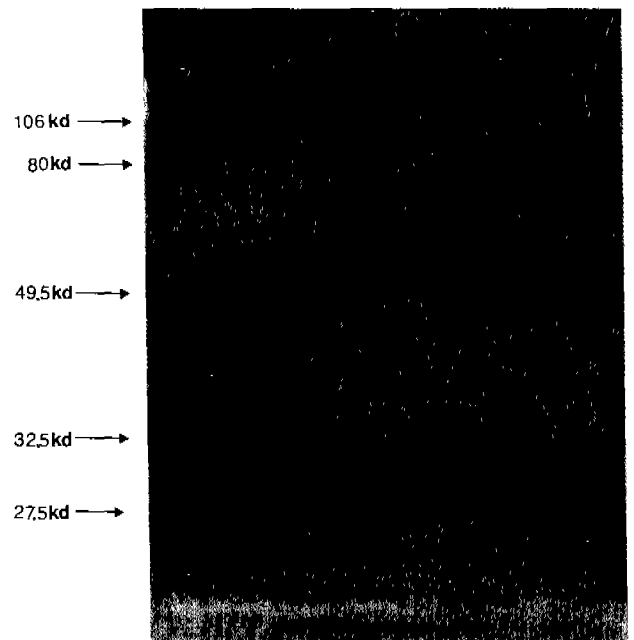


Fig. 1. 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis of total protein antibody. Lanes; M. Molecular marker 106 kd, 80 kd, 49.5 kd, 32.5 kd, 27.5 kd; 1. *E. coli* protein antibody from guinea pig; 2. *E. coli* protein antibody from rabbit; 3. Yeast protein antibody from guinea pig; 4. Yeast protein antibody from rabbit.

모두 yeast protein 항체에 비해 titer 값이 높은 것으로 나타났다.

분리 및 정제된 항체의 순도를 알아보기 위하여 10% SDS-PAGE를 수행한 결과 55 kilodalton(kd)과 27 kd 위치에서 band가 나타났는데, 이것은 각각 항체의 heavy chain과 light chain으로 추정된다. Guinea pig로부터 얻은 yeast protein 항체의 경우에 32 kd 위치에서 band가 뚜렷하게 나타났는데 이것은 항체의 light chain의 일부라고 생각되므로 더 이상의 정제를 행하지 않았다(Fig. 1). IgG의 heavy chain의 분자량은 대략 55,000이며 light chain의 분자량은 대략 25,000 정도인 것으로 보고되어 있으며(Harlow와 Lane, 1988) 항체의 종류에 따라 다소 변화가 있는 것으로 알려져 있다(Johnstone과 Thorpe, 1987).

Sandwich ELISA방법은 ELISA방법 중 가장 sensitive하며 100 pg/ml~1 ng/ml 범위의 protein antigen을 정량할 수 있다고 알려져 있다(Ausubel 등, 1992). Sandwich ELISA 방법을 이용하여 단백질을 정량하는데 있어서 가장 중요한 요소는 guinea pig로부터 얻은 total

protein 항체와 토끼로부터 얻은 total protein 항체의 희석비율을 적절히 조절하는 것으로 판단되어 sandwich ELISA 방법을 이용한 단백질 정량의 감도를 높이기 위하여 guinea pig와 토끼로부터 얻은 total protein 항체의 희석비율을 변화시켜 실험하였다. 실험결과 yeast protein 항체의 경우 guinea pig에서 얻은 항체를 1:100으로, 토끼에서 얻은 항체를 1:10,000으로 희석했을 때 가장 높은 감도를 나타냈다(Table II). Guinea pig에서 얻은 항체를 1:20, 토끼에서 얻은 항체를 1:10,000으로 희석했을 때에는 1 µg/ml~10 ng/ml 범위의 O.D.값이 차이를 나타내지 않으므로 그 범위의 단백질을 정량하기 어려웠으며 guinea pig에서 얻은 항체를 1:50, 토끼에서 얻은 항체를 1:10,000으로 희석했을 때에는 1 µg/ml~1 ng/ml 범위의 단백질을 정량하기 어려웠다. 또한 guinea pig에서 얻은 항체를 1:50, 토끼에서 얻은 항체를 1:100,000으로 희석했을 경우와, guinea pig에서 얻은 항체를 1:100, 토끼에서 얻은 항체를 1:100,000으로 희석했을 때에는 10 ng/ml~1 ng/ml 범위의 단백질을 정량하기 어려웠다. *E. coli* protein 항체의 경우는 guinea

Table II. Determination of remained host-derived protein using sandwich ELISA
A. Yeast protein antibody

c	a	1:20		1:50			1:100	
		b	1:1,000	1:10,000	1:1,000	1:10,000	1:100,000	1:10,000
10 µg/ml		over	1.751 ^d	over	1.697	over	over	1.766
1 µg/ml		over	1.641	over	1.419	over	over	1.366
100 ng/ml		over	1.683	1.744	1.345	1.722	1.379	1.154
10 ng/ml		1.851	1.648	1.456	1.326	1.465	1.086	1.060
5 ng/ml		N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	1.409	1.024	1.009
1 ng/ml		1.683	1.536	1.566	1.431	1.477	0.949	1.057

a. Dilution rate of yeast antibody from guinea pig.

b. Dilution rate of yeast antibody from rabbit.

c. Protein concentration.

d. O. D. at 492 nm.

N. D.: Not done.

B. *E. coli* protein antibody

c	a	1:1,000			1:5,000		1:10,000		
		b	1:1,000	1:10,000	1:50,000	1:1,000	1:10,000	1:1,000	1:10,000
10 µg/ml		over	over	1.537 ^d	over	over	1.216	1.228	0.259
1 µg/ml		over	1.625	1.392	over	1.777	1.103r/0.730	0.075	
100 ng/ml		1.702	1.495	1.377	1.521	0.621	0.000	0.162	0.000
10 ng/ml		1.470	1.394	1.269	0.975	0.593	0.000	0.021	0.000
5 ng/ml		N. D.	N. D.	N. D.	0.838	0.558	0.000	0.000	0.000
1 ng/ml		1.509	1.397	1.272	0.687	0.599	0.000	0.000	0.000

a. Dilution rate of *E. coli* antibody from guinea pig.

b. Dilution rate of *E. coli* antibody from rabbit.

c. Protein concentration

d. O. D. at 492 nm.

N. D.: Not done.

Table III. The quantities of remained host-derived proteins in biotechnological products using sandwich ELISA

Biotechnological products	Detection value	WHO recommendatory requirement
Hepatitis B vaccine	less than 1 ng/ml	less than 1000 ng/ml
Interferon- α	less than 46 ng/ml	
Interferon- γ	less than 1 ng/ml	
Human growth hormone	less than 1 ng/ml	

pig에서 얻은 항체를 1:5,000, 토끼에서 얻은 항체를 1:1,000으로 희석하였을 때 가장 높은 감도를 나타냈다. Guinea pig에서 얻은 항체를 1:1,000으로 희석하고 토끼에서 얻은 항체를 1:1,000, 1:10,000, 1:50,000으로 희석하였을 때와 guinea pig에서 얻은 항체를 1:5,000, 토끼에서 얻은 항체를 1:10,000으로 희석하였을 때 모두 10 ng/ml~1 ng/ml 범위의 단백질을 정량하기 어려웠다 (Table II). Table II에 나타난 흡광도치는 3회 이상 반복실험에 의해 얻어진 값을 평균한 것이다. 이 실험에서 guinea pig로부터 얻은 total protein 항체를 흡착시킨 well에 TTBSA로 희석한 total protein 대신 TTBSA만을 넣어 control로 했을 경우 yeast protein 항체는 1.054, *E. coli* protein 항체는 0.895 정도의 높은 흡광도 값을 나타냈는데 이것은 guinea pig로부터 얻은 total protein 항체가 항 토끼 양고추냉이 피옥시다아제가 결합된 항체와 cross reactivity를 가지고 있기 때문인 것으로 생각된다. Guinea pig에서 얻은 혈청을 1:10,000으로 희석하여 direct ELISA 방법으로 항 토끼 양고추냉이 피옥시다아제와 결합시킨 경우, 23.5% 정도의 cross reactivity를 가진다고 보고되어 있다(Boehringer Mannheim GmbH, 1992). 이점을 보완하기 위하여 guinea pig로부터 얻은 항체를 흡착시키지 않은 well에 TTBSA로 희석한 total protein 대신 TTBSA 300 μ l를 넣어 control로 하였다. 그 결과 yeast protein 항체의 경우 0.000, *E. coli* protein 항체의 경우 0.000~0.035 정도의 낮은 흡광도치를 나타냈다.

Sandwich ELISA 방법을 이용한 생물공학의약품의 숙주유래단백질 검출

국내에서 시판되는 생물공학의약품을 위에서 기술한 sandwich ELISA 방법을 이용하여 숙주유래단백질을 검출한 결과, B형간염 백신제제와 interferon- γ 제제는 1 ng/vial(1 ng/ml) 이하의 단백질이 검출되었으며, interferon- α 제제의 경우는 2~23 ng/vial(4~46 ng/ml)의 단백질이 검출되었다. 또한 사람성장호르몬제제는 3.5 ng/vial(7 ng/ml) 이하의 단백질이 검출되었으며 이 결과는 사람성장호르몬제제마다 다르게 정하고 있는 제조회사 자체 숙주유래단백질 검출법의 실험결과와 유사했다. WHO의 권장 기준치는 1000 ng/ml 이하로 정해져 있으며 실험에 사용한 생물공학의약품의 경우 모두 이 기준치

이하인 것으로 나타났다(Table III). 잔류하는 숙주유래 단백질의 문제점은 이것이 체내에서 면역작용을 일으키는 것이다. 그러나 어느 정도의 양이 체내에서 면역작용을 일으키는 지를 측정하기가 어렵고 특별한 단백질에 대한 면역반응은 복합된 현상이기 때문에 피투여자의 건강상태와 관계가 깊다(Tron 등, 1989; Powers 등, 1989). 그러므로 적은 양의 잔류 단백질만이 면역반응을 일으키는 확률을 줄일 수 있다. 현재 국내에서는 interferon 제제와 간염백신제제에 대한 숙주유래 단백질의 허용범위는 정해져 있지 않으며 사람성장호르몬제제의 경우는 10 ng/vial 이하로 정해져 있지만 의약품의 종류에 따라 잔류 허용범위가 다르다. 현재 숙주유래단백질의 허용범위, 검출방법은 의약품의 종류에 따라 다르기 때문에 검출방법에 있어서 통일성있는 체계를 마련하기 위하여 국내 생물공학제품에 사용되고 있는 *E. coli* K-12와 *S. cerevisiae*의 total protein을 항원으로 하여 토끼와 guinea pig로부터 total protein 항체를 얻어 sandwich ELISA 방법을 이용한 숙주유래 단백질 검출방법을 개발하였으나, *E. coli* K-12의 경우 개발된 균주를 숙주로 사용하고 있는 경우가 많다. 이런 경우 *E. coli* K-12의 개발된 균주만이 가지고 있는 특이한 단백질은 이 방법으로 검출하기 어려우므로 이에 대한 보완책도 마련되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 말씀

이 연구는 1993년도 보건사회부 신약개발 연구지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1992). *Short protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Boehringer Mannheim GmbH (1992). *Analytical report*.
- Briggs, J. and Panfill, R. (1991). Quantitation of DNA and protein impurities in biopharmaceuticals. *Anal. Biochem.* **63**, 850-859.
- Catty, D. (1988) *Antibodies*. IRL Press., Washington DC.
- Chiu, Y. Y. and Gueriguian, J. L. (1991). *Drug biotechnology*

- regulation, scientific basis and practice.* Marcel Dekker INC., New York.
- Deutscher, M. P. (1990). *Methods in enzymology: Guide to protein purification.* Academic Press INC., New York.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988). *Antibodies.* Cold Spring Harbor laboratory, New York.
- Johnstone, A. and Thorpe, R. (1987). *Immunochemistry in practice.* Black well Scientific Publication, London.
- Mathieu, M. (1993). *Biologics development: A regulatory overview.* Parexel International Corporation, Waltham, MA.
- Powers, D. C., Sears, S. D., Murphy, B. R., Thumar, B. and Clements, M. L. (1989). Systematic and local antibody responses in elderly subjects given live or inactivated influenza a virus vaccine. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 2666-2671.
- Tron, F., Degos, F., Brechot, C., Courouce, A. M., Goudeau, A., Marie, F. N., Adamowicz, P., Saliou, P., Laplanche, A., Benhamou, J. P. and Girard, M. (1989). Randomized dose range study of a recombinant Hepatitis B vaccine produced in mammalian cells and containing the S and PreS2 sequences. *J. Infect. Dis.* **160**, 199-204.
- 한국생물산업협회 (1993). 바이오 인더스트리, **2**.