

돼지난자 투명대의 단일클론 항체 생산 및 특성화

이광희* · 이홍준 · 이상호

고려대학교 자연자원대학 응용동물과학과

Production and Characterization of Monoclonal Antibodies to Porcine Zona Pellucida

K. H. Lee*, H. J. Lee and S. H. Lee

Department of Animal Science, College of Natural Resources, Korea University

SUMMARY

The envelope of the mammalian oocyte plays crucial roles in sperm-oocyte interactions by providing sperm receptors, inducing acrosome reaction and preventing polyspermy. Understanding of properties of the zona pellucida (ZP) is essential for the artificial control of fertility in mammals. This study was carried out to produce and characterize monoclonal antibodies (MAbs) to porcine ZP proteins. Approximately 8,000 ZPs were obtained from follicular oocytes and dissolved in 40 μ l of double distilled water. Following immunization through foot-pad injections of Balb/c mice with a ZP solution, the popliteal lymph nodes were recovered at 2 weeks after the last injection. Hybridoma cell lines were established by fusing lymph node cells with P3X63 myeloma cells through selection using HAT medium and screening by immunofluorescence (IF) microscopy on the isolated ZP. Secreted MAbs were found to consist κ chains and different heavy chains as evidenced by isotyping. Some of the MAbs demonstrated high specificity to the ZP in IF. The MAbs also showed positive cross reactivity with hamster and mouse eggs, while negative with bovine eggs. The results implicate that the MAbs can be used not only for identification of functional regions of the ZP, but also for elucidation of mechanisms involved in fertilization of mammals. The MAbs will provide basic information on biochemical anatomy of the ZP as well as can be candidates for the future contraceptive vaccines.

(Key words: porcine, monoclonal antibodies, zona pellucida, glycoprotein)

서 론

포유동물 난자를 둘러싸고 있는 비세포성 외막인 투명대는 특이한 산성 당단백질들로 구성되어 있으며 이들의 합성은 발생학적으로 계획되어진 특정시기에 발현된다. 이들 투명대 단백질은 수정과정 중

정자-난자의 상호작용에 관여하는 정자수용체 결합인자를 갖고 있으며, 수정시에 종 특이성과 깊은 관련이 있어 집중적인 연구의 대상이 되고 있다(Wassarman, 1988). 투명대 단백질 구성분의 하나인 ZP3은 정자 수용체에 대한 ligand로서 그 항체는 정자와 난자간의 수정기작을 밝혀내기 위한 연구도 구로서의 중요성과 수정억제 작용을 이용한 피임백

* 수의과학연구소(Veterinary Research Institute, Anyang, Korea)

신으로서의 잠재적 이용성 때문에 많은 연구가 이루어졌다(Sacco, 1987). 투명대 구성 단백질에 대한 단일클론항체(monoclonal antibodies, MAb)는 생쥐, 쥐 및 돼지에서 만들어져 정자의 침체반응 유기와 같은 생리적 역할을 구명하기 위한 도구로 사용되고 있다(Takagi 등, 1989). 즉, 투명대의 생리적 역할로 수정과 초기배의 발생 중 정자의 결합과 침체반응을 유기고, 정자의 침투성, 수정 중 투명대 변화에 의한 다정자 침입반응 및 발달과정에 있는 초기배의 보호 등이 밝혀졌다(Dumont와 Brummet, 1985).

돼지난자 투명대에 대한 연구는 투명대의 항체를 이용하여 각 항체의 투명대에 대한 면역학적 특성화 노력이 끊임없이 집중되었을 뿐만 아니라, 산양(Tsunoda와 Sugie, 1979), 토끼(Yurewicz 등, 1987, 1993; Dunbar와 Raynor, 1980) 또는 생쥐(Bagavant 등, 1993; Sacco 등, 1989; Takagi 등, 1989; Hendrick와 Wardrip, 1987)에 돼지 투명대를 항원으로 면역하여 생산한 항체의 효과 검토와 이들 항원의 생물학적 기능 연구 등으로 투명대 단백질의 항체를 이용한 기술연구가 초기에 수행되었다. 생체 내에서도 원숭이의 난포형성 중 돼지난자 투명대에 의한 면역억제 조절작용(Upadhyay 등, 1989)등도 조사되었다.

돼지의 MAb에 대한 연구는 투명대 단백질 유전자의 cloning에 의하여 밝혀진 1차 구조를 이용한 MAb의 생산과(Dean 등, 1986), 이를 이용하여 돼지 투명대와 교차반응하는 돼지의 ZP3 β 의 펩타이드 구조상에 존재하는 일련의 항원 결정부위를 인식하였다(Bagavant 등, 1993). 돼지난자 투명대는 물론 생쥐, 햄스터, 원숭이, 사람의 투명대 단백질 유전자의 염기서열상의 공유부위가 밝혀져 면역학적으로 돼지난자 투명대를 항원으로 사용함에 있어 중요함을 제시하였다.

한편, 국내에서는 수정연구를 위한 MAb의 생산은 미미한 상태이며 외국에서의 돼지난자에 대한 다가항체와 MAb의 연구는 수종의 포유동물에서 난자투명대에 대한 화학적, 생물학적인 분석과 함께 수정 중에 관여하는 기능적 영역을 탐색하기 위하여 국소면역 피임백신을 개발하는 데 주력하고 있다. 돼지투명대에 대한 MAb는 투명대의 특이적

항원결정기를 탐색하는 소식자로서 중요한 역할을 할 수 있다. 본 연구는 수정에 관여하는 투명대의 주요 기능을 밝히기 위한 도구로써의 돼지투명대에 대한 MAb를 생산하고, 이들의 특성화 및 가까운 장래에 피임백신 개발을 위한 기초자료로 이용하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시 동물

본 연구에서 사용한 동물은 6주령 이상된 Balb/c생쥐와 4주령 이상된 ICR 생쥐로, 수의과학연구소 동물사육실에서 확립된 사양조건에 따라 유지하였다. 공시동물은 각각 면역용 및 정자 또는 feeder 세포의 획득에 이용되었으며 성숙한 햄스터, 생쥐, 소 및 6주령 이상된 자성돈의 난포로부터 획득한 난자를 공시하였다.

2. 돼지난소의 채취 및 난자의 회수

도축장에서부터 획득한 난소는 보존상태로 실험실에 신속하게 이송하여 무균상태 하에서 조작하였다. 난소 이외의 조직을 제거하고 세정한 후 신선한 생리식염수를 넣은 petri dish에 넣어 2등분하였다. 난자를 회수하기 위하여 No. 21 blade knife를 3mm간격으로 만든 장치로 난소의 표면을 세절하고 2~3분간 정지시켰다. 난소세절액의 상층액을 일부 제거하고 30배율의 실체 현미경하에서 난자-난구복합물(oocyte cumulus complexes, OOCs)을 회수한 다음, 이들을 다시 M2+4% FCS에서 3회 이상 세정한 후 성숙된 난자를 선별하였다(Yoo 등, 1993).

3. 투명대항원의 준비 및 면역

회수된 난자를 3% Na-citrate로 처리하여 미세피펫으로 난자-난구세포를 제거하여 분리한 투명대를 100℃에서 2분간 가열 용해한 후에 10,000×g에서 2분간 원심분리한 다음 상층액을 항원으로 사용하였다. 면역은 극소량의 항원에 의존하는 방법을 모색하여 Coyle 등(1992)의 방법을 일부 변경하여 실시하였다. 즉, 정제된 40 μ g항원을 incomplete Freund's adjuvant와 동량으로 혼합하여 6주령 Balb/c 생쥐의 발바닥에 0.1ml(40 μ g항원)을 주사하여 1차

면역을 실시하였다. 보강접종은 1주일 후에 0.1ml (20 μ g 항원)을 주사하여 실시하였으며 면역개시로부터 2주 후에 슬와부 림프절(popliteal lymph nodes)을 무균적으로 채취하여 융합에 이용하였다.

4. 융합용 형질종양세포의 준비

형질종양세포(P3X63-Ag8.653)중에 항체를 분비하는 세포를 제거하기 위하여 0.13mM 8-azaguanine이 함유된 CM+15% FBS 선택배양액에 처리하여 5%의 CO₂ 항온배양기에 배양하고, 내성세포만을 융합 직전에 Pasteur pipette를 이용하여 용기내벽에서 조심스럽게 분리 후, 4℃에서 1,000g에 10분간 원심분리하여 얻은 세포를 10⁷/ml CM+20% FBS를 재부유시키고, 이를 다시 50ml 원심관에 2~3개로 소분하여 이용하였다.

5. Feeder layer의 준비

잡종세포주의 체외배양에 사용하기 위한 feeder 세포는 아래와 같이 준비하였다. HAT+CM 선택배양액을 4주 이상된 ICR(우)생쥐의 복강 내에 주사하여 복강세포를 추출하였다. 이들 세포에 CM+20% FBS를 이용하여 세포농도를 약 10⁶~10⁷ cells/ml가 되도록 하였다. 정제된 세포는 96-well culture plate에 Pasteur pipette으로 80 μ l/well씩 분주한 다음 38℃ 항온배양기에서 24시간 배양하여 오염 여부를 확인한 후에 사용하였다.

6. 면역된 림프절 세포의 준비

면역된 Balb/c 생쥐를 희생하고 슬와부 림프절을 무균적으로 적출하여 이로부터 결체조직 및 기타 지방조직을 4℃의 DMEM하에서 제거하고 3회 이상 세정하였다. 주사침(26G)을 이용하여 림프조직을 분쇄하고 세포를 4℃에서 1,500rpm으로 5분간 2회 원심분리하여 세정한 후에 형질종양세포와의 융합에 이용하였다. 생존세포수 산정을 위하여 0.4% trypan blue로 세포의 염색을 실시하였다.

7. 세포의 융합

형질종양세포와 면역된 림프절세포의 융합은 Kohler와 Milstein (1975)의 방법을 일부 변경하여 슬와림프절에서 분리된 10⁸개의 세포와 P3-X-63세

포를 2 \times 10⁷개의 비율로 혼합하고 DMEM을 30ml 첨가한 후, 20℃를 유지하며 800 rpm에 10분간 원심분리하여 세정된 세포는 37℃를 유지하며 PEG 1500 1ml를 30초동안 첨가하여 37℃ 항온수조에서 1분간 정치한 후, 위와 동일한 방법으로 30ml의 DMEM을 첨가하고 800rpm에서 5분간 2회 원심분리하여 상층액을 제거한 후, HAT+20%CM 선택배양액 40ml를 첨가하여 하루 전에 준비된 96-well 내의 feeder layer에 80 μ l씩 분주하였다. 융합이 완료되면 3일마다 각 well에 80 μ l HAT배양액을 넣어 선택배양하여 잡종세포주의 집락을 확인하였으며 2주후 HAT 배양액으로 교체하여 계속 배양한 후, 배양상층액을 회수하여 항체 생산 여부를 검사하였다.

8. 잡종세포주의 선별

세포융합 후 잡종세포주의 선별을 위하여 제한희석법과 면역형광항체법을 사용하였다. 96-well plate에 생쥐 복강세포를 CM+15% FCS의 배양액으로 10⁶~10⁷ cells/ml로 희석한 후에 96-well plate에 배양하고, 항체를 분비하는 세포주를 0.5, 5 및 50세포/ml 가 되게 희석하여 각 well당 단일세포집락이 성장하도록 5% CO₂ 항온배양기내에서 1~3주간 배양하였다. 한개 이상의 집락이 well에서 확인되면 이들을 제한희석법을 재실행하여 선별하고, 대량배양을 위해 생쥐 복강세포를 배양한 24-well plate로 옮겨 배양한 후에 25cm² flask에 옮겨 단계적으로 배양하였다. 이후 1,000rpm에 10분간 원심분리에 의하여 세포를 세정하여 기타 분석에 이용하였다.

배양용 dish에 특히 항체를 분비하는 잡종세포주를 선별하기 위하여, 전형적인 집락군이 형성된 각 well의 배양상징액을 채취하여 200배로 희석한 배양액적을 만들고 Yoo 등(1993)의 방법에 의하여 준비한 돼지의 투명대를 5개씩 넣어 실온에서 40분간 반응시켰다. 투명대는 미세피펫을 이용하여 PBS+BSA로 투명대를 3회 세정하고 paraffin으로 기둥을 세운 slide위의 400배로 희석된 FITC-antibody 액적내에 넣고 습도가 유지되는 5%의 CO₂ 항온배양기내에 보관한 후에 PBS+BSA로 3회 세정하여 mounting buffer 1방울을 넣어 coverslip을 놓고 형광현미경상에서 검경하여 형광을 확인하였다. 비

특이적 형광의 검색을 위하여 항체를 제거한 반응을 대조구로 사용하였다. 이 방법은 이종의 난자 투명대와의 교차반응의 확인 실험에도 동일하게 적용하였다.

9. 복수생산 및 단일클론항체의 분리 정제

복수생산을 위하여 10~15일 전에 6~10주령의 Balb/c 생쥐의 복강 내에 0.5ml의 incomplete adjuvant를 주사하였다. 한편, 특징적인 잡종세포주는 대량으로 배양하여 수확하고, 이를 PBS를 사용하여 $1\sim5\times 10^7$ 세포가 되도록 부유시킨 후, 미리 준비된 생쥐의 복강 내에 주사하였다. 이후 10~20일째에 생산된 복수는 Pasteur pipette으로 채취하였다. MAb의 부분적 정제를 위하여, 채취한 복수는 1,000rpm에 10분간 원심분리하여 복강내 세포와 지질을 제거하고 10ml의 복수와 20ml의 60mM acetate buffer(pH 4.0)를 혼합하여 1N HCl로 pH 4.78이 되게 조정하고, 330 μ l의 caprylic acid(octanoic, reagent grade)를 30분간 교반하여 첨가하였다. 교반된 용액은 10,000rpm에 30분간(4 $^{\circ}$ C) 원심분리하여 상층액을 생리식염수에 투석하였다. 정제된 항체들은 -60 $^{\circ}$ C 이하에 보관하며 항체검색에 이용하였다.

10. 단일클론항체의 isotyping

Goat anti-mouse Ig(G, A, M)를 50배 희석하여 ELISA용 96-well plate(Nunc)에 흡착하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응한 후에, ELISA용 PBS로 3회 세정하였으며 건조상태를 확인한 다음, blocking용액을 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 30분간 반응하여 ELISA용 PBS로 3회 세정하여 MAb를 100배 희석하여 넣고 실온에서 1시간 반응하여 3회 세정한 다음, 200배로 희석한 rabbit anti-mouse IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgA, IgM, kappa와 lambda light chain(100 μ l)을 넣어 1시간동안 실온에서 교반하며 반응시켜 3회 세정하였다. HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG를 50배로 희석하여 분주하고 교반 상태에서 1시간 반응하여 3회 세정한 후에 기질인 2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonate(ABTS)를 넣고 10분간 반응시킨 후, ELISA reader를 사용하여 410nm에서 isotype을 결정하였다.

결 과

비세포성 물질인 투명대는 난구세포와 난자 사이의 분리된 층으로 구성되어 있어 기존의 확립된 방법(Dunbar 등, 1980)에 의하여 미성숙 난포란으로부터 회수하였다. 항원의 순수분리 및 체세포의 오염을 방지하기 위하여 3% Na-citrate용액을 이용할 경우 깨끗이 체세포의 잔여물을 제거할 수 있었다. Fig. 1에 보이는 바와 같이 위의 방법에 의하여 분리한 투명대는 체세포의 오염도가 매우 낮아 이들을 100 $^{\circ}$ C에서 용해시켜 항원용액으로 이용하였다.

면역시킨 생쥐의 슬와부임파구 세포를 분리하여 이를 종양세포와 융합시킨 후, 선발과 증식의 반복 과정을 통하여 세포집락(colony)을 최종 선발하였다. 세포융합에 이은 24-well에서의 지속적 배양 후 3일 간격으로 관찰한 바 뚜렷한 세포증식이 확인되었다(Fig. 2). 본 실험에서 Coyle 등(1992)의 방법을 개선키 위하여 추가면역을 실시한 결과, 약 657well 중 453well에서 융합세포를 발견할 수 있었다.

항체의 isotype은 생산된 항체의 특성화 작업에 기초적인 자료를 제공할 뿐만 아니라, 앞으로의 면역반응에 의한 항원항체반응 성질을 구명하기 위하여 긴요하므로 각 면역글로불린의 항체에 의한 ELISA법으로 isotyping을 실시하였다. 한편, MAb의 대량생산을 위한 생쥐의 복수로부터 돼지 투명대 당단백질-특이적인 MAb을 회수하여 이를 isotyping으로 최종 확인하였다. 이들 MAb의 면역글로불린의 조합은 아래 Table 1과 같이 나타났다. 생산된 MAb의 경쇄(light chain)는 모두 κ chain으로 나타났으며 중쇄(heavy chain)는 각각 다른 isotype의 면역글로불린이었다(Table 1). 최초로 선발 확립된 항체중 1D8-2의 경우 중쇄가 IgM으로 나타났으나, 2A5-3, 3B5-9 및 3F7-9의 경우 각각 IgG1, IgG2b 및 IgG2b로서 모두 IgG로 나타났다.

FITC로 표지된 항체를 이용한 면역형광법을 사용하여 생산된 MAb의 투명대 단백질에 대한 특이성을 검토하였다. 형광현미경 하에서 관찰시 투명대 전 부위에 걸쳐 나타나는 형광항체 발현 양태는 섬유상 형태를 나타내는 투명대 표면에 초점을 맞

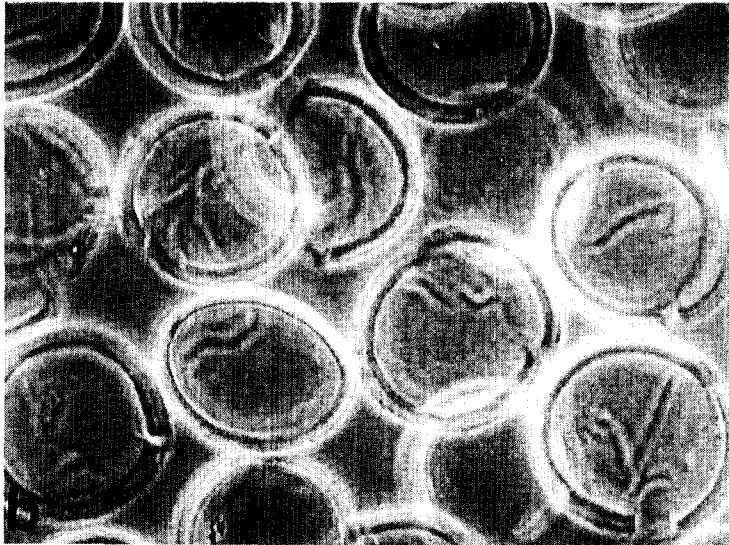
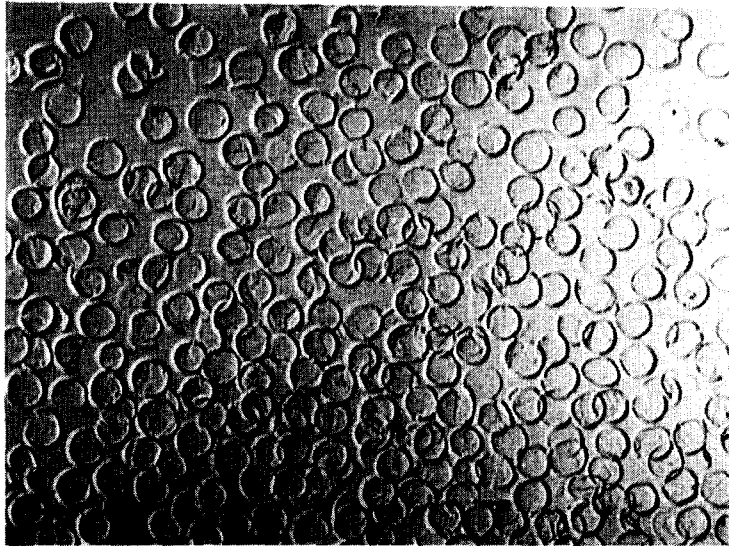


Fig. 1. Empty porcine zonae pellucidae prepared from ovarian follicles. Zonae were obtained as described in Materials & Methods and examined under a microscope to evaluate cellular contaminants from oocyte cytoplasm and follicle cells. Contamination from cellular components is negligible. Magnifications are 40×(a) and 200×(b).

추었을 때 투명대 외곽에서 특이적으로 나타나 투명대의 형태를 그대로 보여 주었다 (Fig. 3). 한편, East와 Dean(1984)은 생쥐투명대-특이적 MAb와 ZP2간의 결합반응에 의하여 나타난 투명대 표면의 결합양식이 섬유질상으로 관찰되었다는 본 실험과

유사한 결과를 보고한 바 있다. 본 결과와 East 와 Dean(1984)의 보고로 미루어 투명대가 균일하지 않은 표면구조를 갖고 있는 것으로 사료된다. 본 실험에서 나타난 결과는 비록 투명대의 구성단백질 전종을 항원으로 사용하였으나, 생산된 항체가 제

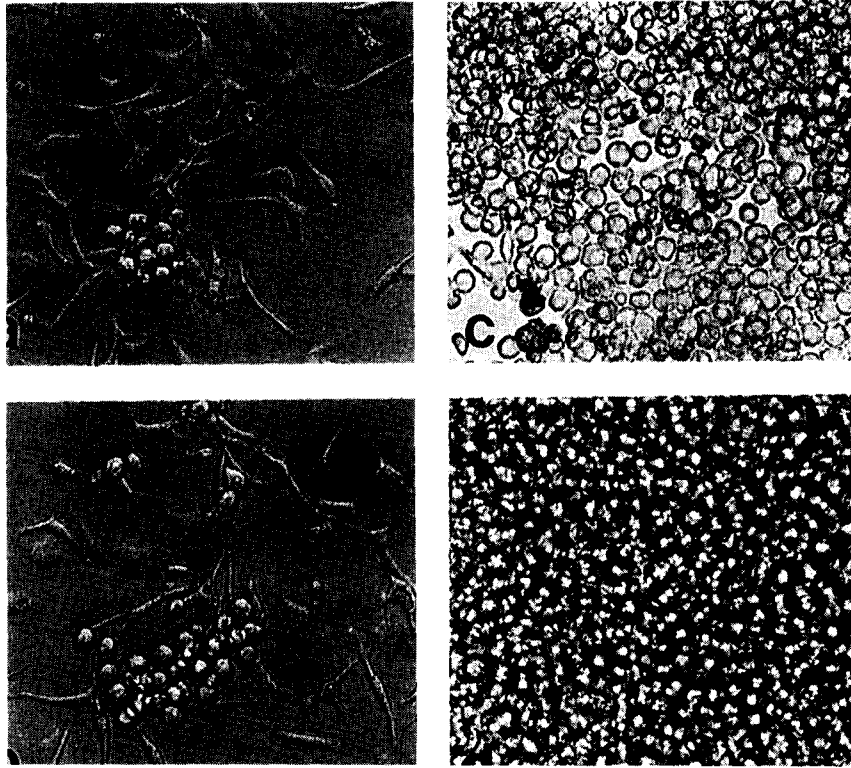


Fig. 2. Proliferation of a hybridoma line after limiting dilution in growth medium. Attached cells are macrophages and round cells are hybridomas. Cells were cultivated for 3 (a), 6 (b), 9 (c) and 12 days (d) after the transfer into 24-well dish.

Table 1. Isotypes of monoclonal antibodies against porcine zona pellucida

Monoclonal antibodies ¹	Isotypes	
	H chain	L chain
2A5-3	IgG ₁	κ
1D8-2	IgM	κ
3B5-9	IgG _{2b}	κ
3F7-9	IgG _{2b}	κ

¹ Antibodies were used in 1:200 dilution with PBS.

한된 표면단백질 항원에 대한 특이성을 나타냄으로써 투명대의 제한된 부위에서만 형광을 발현하여 섬유상으로 관찰되는 것으로 추정할 수 있다. 이에 대한 확실한 증거의 제시를 위하여는 장차 정제된 투명대 단백질을 이용한 항원-항체 결합반응에 의한 추시가 필요하다. 투명대는 그 외막의 형태가 천공

을 이루고 스폰지 형태를 보이는데, 이는 난자의 성숙과정 중에 일어나는 난구세포의 용기가 난자의 표면을 투과함으로써 형성된 것으로 사료된다(Phillips와 Shalgi, 1980). 투명대 상의 섬유상 형태는 주사현미경을 통하여 관찰이 가능한 세부적인 구조이며 이 구조에 특이적인 항체를 이용할 경우 광학현미경하에서도 그 구조의 관찰이 가능하다. 따라서 본 실험에서 얻은 결과는 항체 또는 형광염색방법의 비특이성에 기인한 것은 아닐 것으로 사료된다. 즉 Fig. 3c에 나타난 결과는 투명대 성분을 인지하는 항체의 특이성에 의하여 이들 성분이 투명대의 외부구조를 이루고 있는 섬유상의 구조를 인지하는 것으로 사료된다. 이는 Fig. 4에 나타난 결과에 의하여도 정확하게 확인할 수 있었다. 즉 면역이전의 정상혈청을 이용한 면역형광법에 의하여 투명대 상의 형광 염색이 전혀 나타나지 않았으나

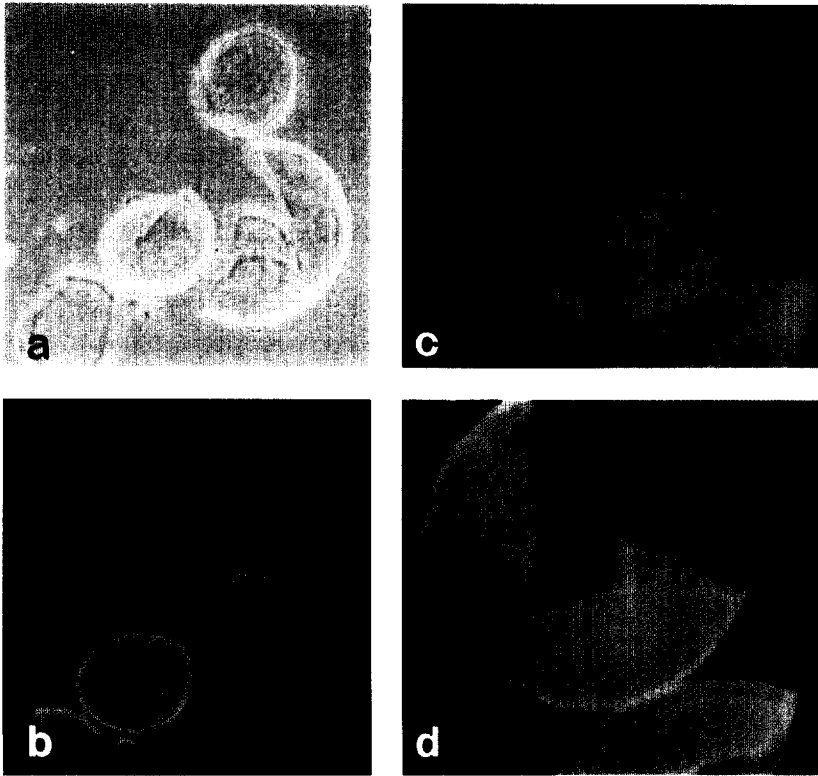


Fig. 3. Indirect immunofluorescence staining of porcine zona treated with monoclonal antibody. Morphology of porcine zona is seen under light microscopy(a). There are marked positive reactions in porcine zona respectively(b, c, d). Especially, fibrinous-like positive response is shown(c).

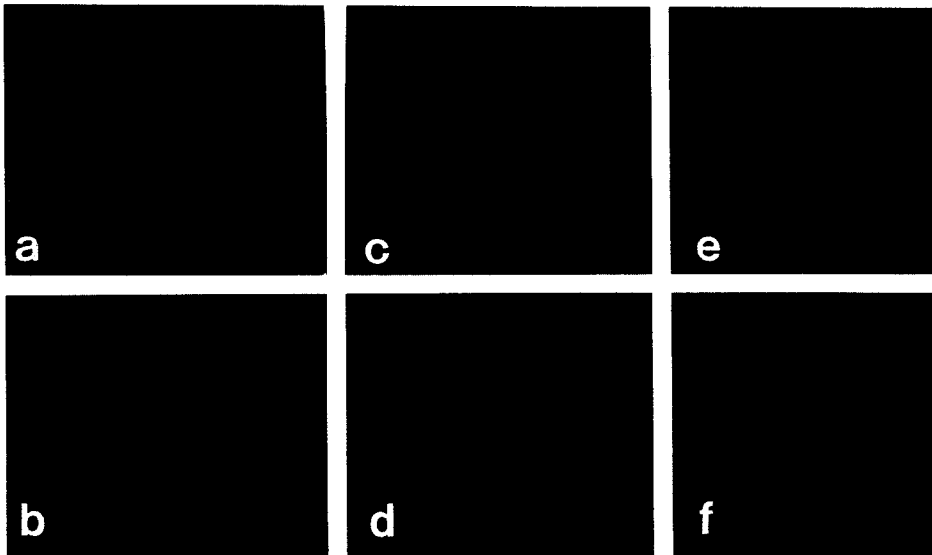


Fig. 4. Indirect immunofluorescence staining of porcine zona treated with monoclonal antibody. Indirect immunofluorescence staining of porcine zona, treated with normal serum(a), polyclonal antibody(b), 2A5(c), 1D8(d), 3B5(e) and 3F7(f).

(Fig. 4a), 그 밖의 투명대 단백질에 대한 항체들의 사용시에 비록 형광 염색의 양식에 약간의 차이가 관찰되었으나, 번역염색이 확인되어 본 실험에서 생산한 항체들의 투명대 당단백질·특이성 및 형광염색방법의 특이성이 확인되었다(Fig. 4b, c, d, e and f).

포유동물 정자와 난자의 투명대 상에는 서로 상보적인 분자들이 존재하여 이들 간의 상호 인지에 의하여 정자·난자의 융합이 개시된다. 체외수정시 발견되는 수정률의 저하에 대한 추측되는 원인 중의 하나로 정자표면의 투명대 수용체의 결함 또는 이들 수용체에 상대적인 투명대 상의 ligand상의 결함을 들 수 있다. 생쥐의 ZP3는 정자결합능력이 있으며 또한 접체반응을 유기하는 것으로 밝혀졌으며 (Florman와 Wassarman, 1985), 분리·용해한 ZP3는 온전한 투명대에 비하여 종에 대한 비특이성을 나타내는 것으로 나타났다(Moller와 Wassarman, 1989). 따라서 수정시 정자와 난자간의 인지와 결합에는 종특이적인 투명대 단백질 또는 기타 물질과 비특이적인 요인의 상호 조합에 의하여 이루어지는 것으로 추정된다. 본 실험에서 생산된 항체들의 종간 투명대 단백질에 대한 교차반응을 검토함으로써 항원의 종특이성을 규명코자 하였다. Table 2에 나타나 바와 같이 본 실험에서 생산된 항체는 소를 제외한 생쥐 및 햄스터의 ZP3와 반응교차성을 보였다. 이는 이들 항체에 대한 항원이 분자구조가 종간에 매우 유사한 투명대 구성분일 것으로 추정된다. 여러 연구보고에 의하면 본 결과와 유사한 각 항체의 종간 교차반응이 다양하게 나타나며, 최근에는

특정종의 항원이 기타 종에서도 존재한다는 보고가 있다(Bagavant 등, 1993; Sacco 등, 1977). 포유동물 종별 투명대에 대하여 생산된 MAb들의 반응은 돼지의 투명대에서 보였던 형광항체와 동일한 발현양상을 보인 본 실험의 결과는 Bagavant 등(1993)이 시사한 생쥐 투명대에 대한 MAb(MA-30)가 돼지의 투명대 단백질인 ZP3 β 의 단편인 6kDa에 반응함에 미루어 생쥐와 돼지의 투명대 단백질간 공유부위의 존재 가능성에 대한 간접적 증거를 제시하였다. 본 결과에 의하면 소의 투명대와는 교차반응을 나타내지 않았는데 이로 미루어 생쥐 및 햄스터에는 돼지의 투명대 항원과 유사한 구조를 지닌 단백질이 존재하지만, 소의 경우에는 보다 구조가 다른 소 특이적인 단백질구조를 가지고 있음을 추정할 수 있다.

본 연구를 통하여 개발된 항체의 특이성은 투명대 제한적으로 나타났다. 이들 항체는 비록 증기가 정황적이기는 하지만, 돼지 투명대 단백질에 특이적인 것으로 보이며 이들 단백질 중 특히 종간 그 구조가 잘 보존된 ZP3의 일부가 항원일 것으로 사료된다. 항체와 정제된 ZP3와의 교차반응으로부터 얻은 결과는 이의 가능성을 제시해 준다. 최근 본 연구진은 이들 항체의 투명대 특이성을 번역조직화학법에 의하여 확인한 바 있으며, 현재 immunoblotting의 방법을 통하여 이의 구명을 시도하고 있는 중이다. 따라서 본 실험을 통하여 확립된 항체는 수정기전의 구명은 물론 나아가서 궁극적인 피임수단으로서의 잠재적 가치를 지니는 것으로 사료된다.

Table 2. Cross reactivity of porcine ZP antibodies with ZP3 from other species¹

Antibodies	Cross reactivity among species ²			
	Pig	Mouse	Hamster	Cattle
Normal serum	-	-	-	-
Polyclonal	+	+	+	-
2A5-3	+	+	+	-
1D8-2	+	+	+	-
3B5-9	+	+	+	-
3F7-9	+	+	+	-

¹ Indirect immunofluorescence microscopy was used to determine cross reaction.

² -, negative and +, positive reaction.

적 요

투명대는 정자-난자 상호작용 중 정자수용체로, 침체반응 유기물질 및 다정자침입 거부반응의 발현에 중요한 역할을 한다. 투명대의 이같은 성질에 관한 이해는 포유동물에 있어 인위적 번식의 조절에 필수적이다. 본 연구는 이를 위하여 돼지 투명대에 대한 단일클론항체 생산 및 특성화 연구를 수행하여 수정과정 중에 이들 항체의 생물학적 기능을 구명하고자 하였다. 투명대 단백질은 약 8,000개의 돼지 투명대를 이용하여 40 μ l 증류수에 준비하였다. Balb/c 생쥐 발바닥에 면역주사한 후, 2주 후에 hybridoma 세포를 슬와부 임파구세포와 P3X63 형질종양세포를 융합하여 확립하였다. 생산된 4개의 단일클론항체는 간접면역형광항체법, 조직화학분석 등에 의하여 매우 특이하게 작용하는 항체임을 보여주었다. 또한, 단일클론항체들은 헬스터와 생쥐에 대하여 각각 교차반응을 나타내었으나 소에 대하여는 반응을 나타내지 않았다. 항체의 isotype은 κ chain으로 되어 있었으며 heavy chain은 서로 다른 것으로 결정되었다. 이와 같은 결과는 확립된 단일클론항체가 수정에 관여하는 투명대의 기능적 영역을 동정할 뿐만 아니라, 가축의 수정과정에 대한 연구에도 유용하리라는 것을 보여준 것이다. 더욱이 이들 단일클론항체는 투명대의 생화학적 해부에 대한 기초적인 정보를 제공함으로써 가까운 장래에 피임백신을 개발하는데 중요하게 이용될 수 있을 것이다.

참고문헌

Bagavant H, Yurewicz EC, Sacco AG, Talwar GP and Gupta SK. 1993. Block in porcine gamete interaction by polyclonal antibodies to a pig ZP3 β fragment having partial sequence homology to human ZP3. J. Reprod. Immunol., 25, 277-283.

Coyle PV, Wyatt D, McCaughey C and O'Neill HJ. 1992. A simple standardized protocol for

the production of monoclonal antibodies against viral and bacterial antigens. J. Immunol. Meth., 153, 81-84.

Dean J, East IJ and Shimizu S. 1986. Biosynthesis of the mouse zona pellucida and the effect of anti-zona monoclonal antibodies on fertilization and early development. Dev. Biol., 25, 107-116

Dumont JN and Brummett AR. 1985. Egg envelopes in vertebrates. In: Developmental biology: A comprehensive synthesis. Browder L.W. ed., vol 1, pp. 235-288.

Dunbar BS and Raynor DB. 1980. Characterization of porcine zona pellucida antigens. Biol. Reprod., 22, 941-954.

Dunbar BS, Wardrip NJ and Hedrick JL. 1980. Isolation, physicochemical properties, and macromolecular composition of zona pellucida from porcine oocytes. Biochemistry, 19, 356-365.

East IJ and Dean J. 1984. Monoclonal antibodies as probes of the distribution of ZP2, the major sulfated glycoprotein of the murine zona pellucida. J. Cell Biol., 98, 795-800.

Florman HM and Wassarman PM. 1985. O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity. Cell, 4, 313-324.

Hedrick JL and Wardrip NJ. 1987. On the macromolecular composition of zona pellucida from porcine oocytes. Dev. Biol., 121, 478-488.

Koheler G and Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 256, 495-497.

Moller CC and Wassarman PM. 1989. Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs. Dev. Biol., 132, 103-112.

Phillipis DM and Shalgi RM. 1980. Surface properties of the zona pellucida. J. Exp. Zool.,

- 213, 1-8.
- Sacco AG, Yurewicz EC, Subramanian MG and Matzat PD. 1989. Porcine zona pellucida: association of sperm receptor activity with the α -glycoprotein component of the Mr = 55,000 family. *Biol. Reprod.*, 41, 523-532.
- Sacco AG. 1977. Antigenic cross-reactivity between human and pig zona pellucida. *Biol. Reprod.*, 16, 164-173.
- Sacco AG. 1987. Zona pellucida: current status as candidate for contraceptive vaccine development *Am. J. Reprod Immunol. Microbiol.*, 15, 122-130.
- Takagi J, Dobashi M, Araki Y, Imai Y, Hiroi M, Tonosaki A and Sendo F. 1989. The development of porcine zona pellucida using monoclonal antibodies: II. Electron microscopy. *Biol. Reprod.*, 40, 1130-1131.
- Tsunoda Y and Sugie T. 1979. Production of hetero-antibody to isolated pig zonae pellucidae. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 50, 493-498.
- Upadhyay SN, Thillaikoothan P, Bamezai A, Jayaraman S and Talawar GP. 1989. Role of adjuvants in inhibitory influence of immunization with porcine zona pellucida antigen (ZP3) on ovarian folliculogenesis in bonnet monkeys: a morphological study. *Biol. Reprod.*, 41, 665-673.
- Yoo HJ, Choi SC, Park SS and Lee SH. 1993. Maximization of the number of follicular oocytes recovered from bovine ovaries. *Korean J. Anim. Reprod.*, 17, 149-157.
- Yurewicz EC, Hibler D, Fontenot GK, Sacco AG and Harris J. 1993. Nucleotide sequence of cDNA encoding ZP3 α , a sperm binding glycoprotein from zona pellucida of pig oocyte. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1174, 211-214.
- Yurewicz EC, Sacco AG and Subramanian MG. 1987. Structural characterization of the Mr = 55,000 antigen (ZP3) of porcine oocyte zona pellucida. *J. Biol. Chem.*, 262, 564-571.