

효소면역측정법 (ELISA)을 이용한 유전자 재조합 히루딘의 정량

최윤주* · 한범수 · 안미영 · 박병근 · 손정훈* · 최의성* · 이상기* · 김영식*

(Received July 22, 1996)

Quantitation of Recombinant Hirudin by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Yun Joo Choi*, Bum Soo Hahn, Mi Young Ahn, Pyung Keun Park,
Jung Hoon Sohn*, Eui Sung Choi*, Sang Ki Lee* and Yeong Shik Kim*

Natural Products Research Institute Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

*Korea Research Institute Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-333, Korea

Abstract—A polyclonal antibody against recombinant hirudin was raised for the development of a ELISA in biological fluids. Recombinant hirudin was conjugated to maleimide activated carrier protein, KLH and injected to a rabbit. The third booster collection of antiserum was used as primary antibody for the ELISA. The titer for the detection antibody was determined. The direct ELISA could determine the concentration of hirudin in the range of ~10 ng/ml. Affinity purified IgG was obtained and conjugated to horseradish peroxidase. Purified IgG and IgG-HRP could be used as capture and detection antibody, respectively. Although sandwich ELISA would not give the satisfactory results, it could apply for the detection of hirudin level in the range of ~20 µg/ml.

Keywords □ ELISA, hirudin, thrombin inhibition.

히루딘은 항응고제로 40년전에 의학용 거머리 (*Hirudo medicinalis*)로부터 분리 정제되었다.¹⁾ 65개의 아미노산으로 구성된 단일 사슬의 폴리펩타이드로서 thrombin과 1:1로 결합하여 가장 강력하고 특이적인 작용저해제로 알려져 있으며²⁾ 헤파린 대신 동물과 사람에게 대해서 새로운 항응고 및 항혈전제로서의 높은 가능성을 보여주고 있다.³⁾ 히루딘의 아미노산 서열의 규명으로 최근에 들어 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조된 히루딘 (r-히루딘)의 대량생산⁴⁻⁵⁾ 길이 트여짐에 따라 치료약으로써 임상실험 및 독성실험이 가능하게 되었다. 천연의 히루딘과 r-히루딘의 명백한 차이는 r-히루딘의 경우 63번의 위치의 tyrosine에 sulfate기가 없는 점이다.⁶⁾ 히루딘의 잠재적 응용분야는 정맥 및 동맥의 혈전

증⁷⁻⁸⁾, 체외순환(extracorporeal circulation)⁹⁾, 기타 혈관폐색증¹⁰⁾ 등이다. 특히, 히루딘은 헤파린과는 달리 antithrombin III (AT III)의 protease저해제를 요하지 않고 직접적으로 thrombin을 저해시키는 작용을 하기 때문에 범발성 혈관내 응고증 (disseminated intravascular coagulation)에 효과를 기대할 수 있다.¹¹⁾ 저자는 유전공학 기술을 이용해 국내에서 처음으로 만들어진 히루딘에 대해서 실험실내의 활성검색방법과 동물내에서의 활성검색방법 등을 통하여 r-히루딘의 약리학 적 평가에 관한 결과를 보고한 바 있다.¹²⁾ 그러나, 이러한 기능성 활성 측정 방법을 이용하여 히루딘의 혈장내 농도 뿐만 아니라, 활성도 측정할 수 있지만 측정할 수 있는 한계가 µg 범위이기 때문에 면역학적 방법을 이용한 정량 방법의 개발이 요구되고 있다.¹³⁻¹⁴⁾

히루딘과 사람의 thrombin은 생쥐에서 매우 면역성이 낮은 것으로 알려져 있다.¹⁵⁻¹⁶⁾ 현재 까지 히루딘 항

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-740-8929 (팩스) 01-762-8322

체를 만들기 위하여 직접 동물에 주사를 하였지만 항체를 얻기가 어려웠다.¹⁷⁻¹⁸⁾ 다른 방법으로서 BSA와 같은 carrier 단백질질을 결합시켜 항원으로 사용하거나¹⁹⁾ 트롬빈과 히루딘의 복합체에 대해서 항체를 만들어 히루딘의 epitope에 대해서 단일클론성 항체를 만들었다.²⁰⁾ 본 연구는 히루딘의 disulfide 결합이 있다는 것에 착안을 하여 maleimide로 활성화된 KLH (keyhole limpet hemocyanin)와 환원된 히루딘을 화학적으로 결합시켜서 다클론성 항체를 제조하여 ELISA 방법에 의한 히루딘 정량 방법을 확립하였다. 이 방법에 의해 $10^{-9} \sim 10^{-10}$ g/ml의 농도 범위 내에서 히루딘 농도의 측정이 가능하였다.

실험방법

재료

R-히루딘은 *Saccharomyces cerevisiae*에서 발현시켜 분비된 것을 HPLC를 이용하여 정제한 것으로 한국과학기술연구원 생명공학연구소에서 제공받았다. 천연의 히루딘은 거머리의 습성이나 채취조건에 따라서 여러 변형체들이 발견 되었으며 제공받은 r-히루딘은 iso-form으로 r-HV2이며 순도는 HPLC상에서 99% 이상이었다. 이것의 thrombin 저해 활성은 11,000 ATU/mg이었다.

Imject maleimide activated keyhole limpet hemocyanin (IM-KLH)는 Pierce 제품을 사용하였고 Freund's adjuvant (complete, incomplete), o-phenylenediamine (OPD), horseradish peroxidase (Type VI-A, HRP), HRP-2차항체, Chromozym TH (N-p-tosyl-gly-pro-arg-p-nitroanilide) 등을 Sigma에서 구입 하였다. 태내 송아지 혈청 (fetal calf serum, FCS)는 GIBCO제품이고, Tween 20은 Bio-Rad의 것이었고 Protein A-Sepharose CL-4B는 Pharmacia 제품이었다. 96판 microplate (ELISA 용)는 Corning제품이었고, 마취제인 ketamine은 유한양행 제품이었고 기타 시약은 시약용 특급을 사용하였다. 나일론 및 니트로셀룰로스 막은 Schleicher & Schuell 사의 것이었다.

Microplate reader (Emax)는 Molecular Devices 제품으로 Macintosh 컴퓨터에 연결되어져 소프트웨어 프로그램에 의하여 데이터가 정리되었다. Hitachi제품의 자외선 분광기, Pharmacia제품의 연동 펌프등이

실험에 사용되었다.

실험동물

Sprague-Dawley계 흰쥐 180 g에서 250 g 이내의 수컷을 1주 이상 서울대학교 천연물과학연구소 동물실에서 사육하여 실험에 사용하였고 실험에 사용하기전 고형사료(삼양사료) 및 물을 충분히 공급하였다.

히루딘에 대한 다클론성 항체의 제조

R-히루딘을 carrier 단백질인 KLH와 결합시켜서 항체 제조를 위한 항원으로 사용하기 위하여 우선, 히루딘의 disulfide 결합을 환원시켰다. 간단히 요약하면, 히루딘 3 mg에 물 180 μ l를 넣어 녹이고 mercaptoethanol 20 μ l를 가해 전체를 200 μ l로 만들었다. 1시간 동안 37°C에서 방치시킨 다음 95°C에서 30분간 가열하였다. 다음, 0.02 M EDTA가 포함된 인산 완충액 (pH 7.2), 용액에서 투석을 하였다.

IM-KLH를 물 1 ml에 녹여 10 mg/ml로 만들었고 위의 환원된 히루딘 1 ml (3 mg/ml)에 300 μ l의 IM-KLH를 가해 섞은 다음 2시간 동안 실온에서 방치하였다. 투석을 한 후 결합체를 정제하여 -20°C에서 보관 및 사용하였으며 항체를 만들기 위해 결합체 500 μ l와 complete Freund's adjuvant (CFA) 500 μ l를 잘 섞어서 토끼의 (2.1 kg) 대퇴 근육에 250 μ l씩 두번 주사하였고 피하에 100 μ l씩 한번 주사하였다 (전체 600 μ l 주사). 12일 후에 혈액을 채취하여 혈청 1 ml를 얻었다. 2주후 항체 생성의 증폭을 위해서 같은 방법으로 결합체 400 μ l에 incomplete Freund's adjuvant 400 μ l를 잘 섞어서 800 μ l를 토끼에 주사하였다 (3.0 kg). 주사한 후 12일째에 혈액을 채취하여 혈청을 제조하였다. 3주후 3번째 주사를 하여 면역을 시킨 후 혈액은 심장에서 2번 채취하여 45 ml의 혈청을 얻을 수 있었다.

효소면역측정법을 이용한 히루딘의 항체 측정

Blot Assay에 의한 항체 확인 - 니트로셀룰로스막을 3×4 cm 크기로 준비한 후 TBS완충액 (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.5)에 천천히 담가 적시고 여과지 위에서 말렸다. 환원된 히루딘 (4 μ g), r-히루딘 (10 μ g), KLH 공액체 (15 μ g), KLH (20 μ g)에 대한 나일론 및 니트로셀룰로스막에 대한 단백질 결합력을 시험하였다.

Microtiter plate well에 히루딘 흡착 - 히루딘을 결합

완충액 (0.1 M 탄산나트륨, pH 9.6)에 녹여 1 mg/ml의 농도로 제조하여 20배 희석시켜 50 µg/ml로 만들었다. 점차적으로 히루딘 용액을 희석시키면서 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 히루딘 용액을 제거후 차단완충액 (3% w/v gelatin, TBS) 200 µl를 채우고 실온에서 2시간 방치하였다. 다음, 2회 세척완충액 (0.05% Tween 20, TBS, pH 7.5)로 씻어내었다. 결합된 정도를 thrombin저해 시험을 통하여 확인하였다. 각 공간에 thrombin (0.3 NIH units/ml) 100 µl를 채우고 실온에서 1시간 방치시켰으며 Chromozym TH기질 (250 µM) 100 µl를 넣고 3분간 반응 시킨 후 바로 405 nm에서 흡광도를 읽어서 thrombin 작용을 시험하였다.

히루딘 항체의 생성 여부 측정 - 히루딘, 환원된 히루딘, KLH 결합 히루딘 및 KLH를 각각 20 µg/ml, 10 µg/ml의 농도로 각 시료를 준비하여 공간 (well)에 위의 방법을 이용하여 결합시켰다. 차단은 FCS를 이용하여 실시하였고 항혈청과의 반응은 면역전 혈청과 1차 면역, 1차, 2차 증폭제 투여후의 혈청을 1:100, 1:500, 1:1000비율로 희석시켜 100 µl씩 넣어 항원, 항체의 복합체를 만들었다. 판을 덮고 실온에서 1.5시간 방치후 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 두번째의 항체 (Goat anti-rabbit IgG coupled to peroxidase)를 200배 희석하여 판의 모든 well에 100 µl씩 채우고 실온에서 2시간 방치하였다. 판에 남아 있는 두번째 항체 용액을 제거하고 세척완충액으로 4번 씻었다. 효소의 활성을 측정하기 위해서 *o*-phenylenediamine (OPD)를 0.05 M 인산-구연산완충액 (pH 5.0)에 0.5 mg/ml로 녹인 후 10 ml당 4 µl의 10% H₂O₂를 사용 직전에 첨가하여 판의 모든 공간에 100 µl씩 넣어주었다. 실온에서 5분 동안 방치한 후 3 M 황산 50 µl씩을 각 공간에 첨가하여 반응을 중단시켰다. Microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도 값을 읽었다.

히루딘-thrombin 복합체에 대한 항체의 결합 - 위의 방법을 이용하여 히루딘을 판에 코팅을 시키고 코팅된 공간중 반은 100 µl의 thrombin (10 NIH units/ml)를 채우고, 반은 희석용 완충액을 100 µl씩 채웠다. 이것을 실온에서 1시간 방치하였다. 세척과 항혈청 (3rd booster bleeding)과의 처리를 끝낸 후 위와 같은 방법으로 실시한 후 기질 (Chromozym TH)을 넣고 405 nm에서 흡광도를 읽었다.

샌드위치 ELISA 방법을 이용한 히루딘의 정량

다량론성 항체의 정제 - Protein-A Sepharose 300 mg을 PBS 완충액 (pH 8.0)을 이용하여 팽창시킨 후 1 ml정도 칼럼에 채웠다. 같은 완충액으로 평형을 시킨 후 항혈청을 직접적으로 칼럼에 주입하여 칼럼에 결합되는 것과 결합되지 않는 분획으로 나누었다. 280 nm에서 흡광도가 거의 확인되지 않을 때 까지 유속 6 ml/h로 유지시키면서 PBS 완충액으로 칼럼을 씻고, 0.1 M 구연산 (pH 3.0)을 흘려주어 결합된 IgG를 시험관당 2 ml씩 분취하였고 유리시키기 전에 시험관에 미리 2 M Tris 염용액을 200 µl씩 채워 주었다. 모은 IgG 분획을 PBS (pH 7.3)에서 투석 시켰으며 유리된 분획과, 칼럼에 결합되지 않은 분획 모두의 경우 ELISA를 실시하였다. 또한, 유리된 항체에 대해서 SDS-PAGE (reduced)를 하여 IgG를 확인하였다.

정제된 항체에 horseradish peroxidase (HRP)의 결합²¹⁾ - 우선 정제된 항체를 0.1 M 인산완충액에서 투석을 시키고 (1 mg/ml) 이 중 2 ml를 결합에 사용하였다. HRP 10 mg을 0.1 M 탄산염 완충액 (pH 9.2)에 녹였다. 0.5 ml의 NaIO₄와 잘 섞어서 빛을 차단한 상태로 2시간 동안 실온에서 방치하였다. 작은 유리 칼럼에 투석시킨 IgG용액을 넣고 산화시킨 HRP용액을 가하고 Sephadex G-10 1 g을 가하였다. 어둠에서 하룻밤 방치후 1.5 ml 탄산염 완충액으로 씻었다. 흘러나온 용출액을 125 µl의 NaBH₄ (375 µl)로 어둠속에서 1시간 동안 환원 시켰다. 동량의 포화 유산암모늄 용액을 4°C에서 하룻밤 방치후 12000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 침전물을 포화 유산암모늄 용액으로 씻은 후 TEN (Tris/EDTA/NaCl)용액으로 투석을 시켜 사용하였다. 1% BSA를 가하여 4°C에서 보관, 사용하였다.

샌드위치 방법을 이용한 히루딘의 측정 - 결합 항체로 위의 Protein-A affinity chromatography에 의해서 정제된 항체를 판에 결합을 시키기 위해 결합완충액으로 희석하여 1:200부터 2배씩 연속적으로 희석시켜 100 µl씩 위의 방법대로 결합 시켰다. 차단, 세척을 보통의 방법으로 하였고, 항원을 100 µl씩 1시간 반응시켰다. 대조군으로는 BSA를 같은 농도로 희석하여 사용하였다. 검색 항체로 결합 항체에 위의 방법을 이용하여 HRP를 결합시킨 IgG-HRP를 1:100으로 희석시켜 100 µl씩 37°C에서 1시간 반응시켰다. 위의 서술된 방법대로 기질을 넣고 흡광도를 측정하였다. IgG-HRP의 96판에 결합된 것을 확인하기 위해서 항원을 결합시키

고 IgG-HRP를 1:40으로 희석시켜 ELISA를 하였다.

결과 및 고찰

IM-KLH와 히루딘의 결합

Maleimide기가 -SH 그룹에 반응을 하기 때문에 히루딘의 disulfide 결합을 환원시킨후 사용하였다. 특히, 히루딘과의 결합시 완충액에 EDTA를 넣은 것은 산화방지용이었다.

효소면역측정법을 이용한 히루딘의 항체 측정

항체가 생성되었는지 확인하기 위해서 우선 항원에 대한 니트로셀룰로오스막에 결합 능력 시험을 하였을 때 r-히루딘과 환원된 히루딘은 니트로셀룰로오스막에 거의 친화력이 없지만, KLH-히루딘 결합체, KLH는 니트로셀룰로오스막에 보통의 단백질처럼 결합 능력이 높은 것을 Coomassie Blue 염색에 의해서 확인하였다. Dot-blot assay를 위해서 항원으로 KLH-hirudin 공액체를 사용하였다. 이 때 니트로셀룰로오스막 위에서 양성 반응을 보인 것으로 보아서 항체가 만들어졌다는 것을 알 수 있었다 (결과 미기재). 니트로셀룰로오스막에서 히루딘의 결합이 약하므로 96판에서 히루딘의 결합 여부를 확인하였다. 히루딘의 농도를 희석시켜서 10 µg/ml의 농도로 96판에 코팅을 시키고 항원을 주사하고 희수한 첫 번째 항체, 두 번째 항체, 세 번째 항체를 반응

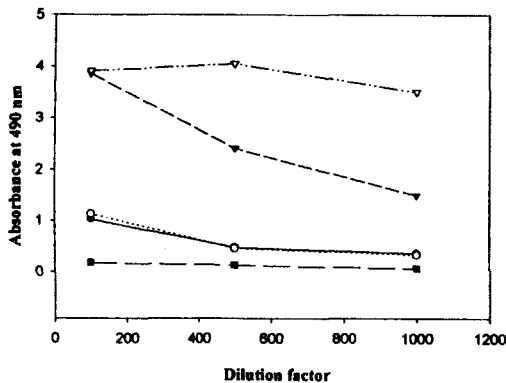


Fig. 1 — Direct ELISA of native hirudin using antisera collected after injection to a rabbit. —▽— antiserum after third injection of hirudin with the booster, —▼— antiserum after the second injection of hirudin with the booster, —●— antiserum after primary injection, —○— pre-immune serum before injection of hirudin, —■— blank well coated with FCS (10 µg/ml).

시키고 이차 항체를 처리하여 얻은 결과가 Fig. 1에 나타나 있다. 면역시키기 전의 혈청을 100배 희석시켰을 때 양성 반응이 나타났지만 혈청을 1000배 희석하였을 때, 위의 히루딘과의 항원, 항체 반응은 면역후에 얻어진 혈청과의 반응에 비해서 낮았다. 실제적으로 판위에 결합된 양은 5 µg에서 50 ng 범위내에서 발색 기질로 측정이 가능하였다. 이 결과는 r-히루딘과 KLH 모두에 대해서 항체가 생긴 것을 나타낸다.

히루딘의 결합 농도와 두번째 항체 — 효소 농도의 결정 세번째 증폭제를 투여후 채혈 및 제조한 혈청을 1:10000으로 희석시키고 두 번째의 항체를 1:2000으로 처리하였을 때 결과가 Fig. 2a에 나타나 있다. 결합된 히루

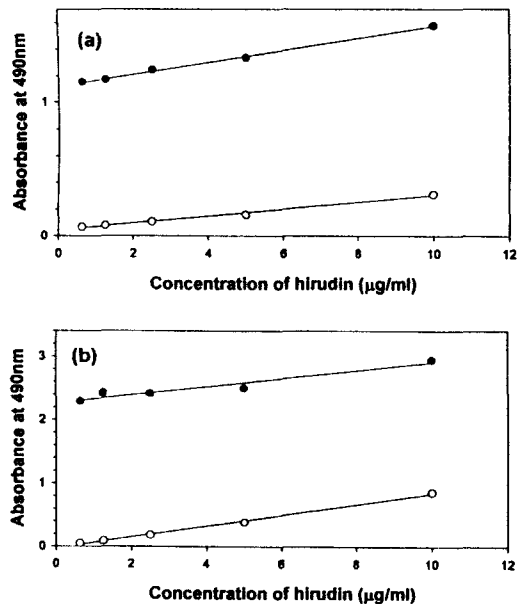


Fig. 2 — Determination of the titer of primary antiserum and secondary antibody conjugated to HRP (a) —●— The antiserum was diluted in the ratio of 1 to 10000 and HRP conjugated anti-IgG antibody was diluted in the ratio of 1 to 2000. They were incubated as described in Materials and Methods. —○— Pre-immune serum was incubated with HRP conjugated anti-IgG antibody as described in Materials and Methods. (b) —●— The antiserum was diluted in the ratio of 1 to 1000 and secondary antibody was diluted in the ratio of 1 to 1000. They were incubated as described in Materials and Methods. —○— Pre-immune serum was incubated with as described in Materials and Methods.

던 농도가 10 $\mu\text{g/ml}$ (결합 농도: 1 μg 이하) 이내에서 가능하였다. 또한, 두번째의 항체를 1:1000으로 희석하였을 때 결과가 Fig. 2b에 있으며 두 개를 비교하였을 때 검색 항체의 농도가 2배 증가하였을 때 흡광도가 2배 이상 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 항원의 결합 농도를 더 낮출 수가 있다고 판단되었다. 실제적으로 생성된 항체의 역가를 측정하기 위해서 항체를 두배씩 희석 시키면서 반응시키고 히루딘의 결합 농도를 10.0 ng/ml (실제의 결합 농도: 1 ng 이하) 이내에서, 그리고 흡광도는 1.0 이내에서 최적화 시킬 수가 있었다 (Fig. 3). 따라서, 가장 적합한 항체의 희석 농도는 3번째 증폭제를 주사한 후의 항체를 1:1000으로 희석시키고 두번째의 항체도 1:1000으로 희석시켜서 사용할 때이고 검출 가능한 히루딘의 양은 $10^{-10} \sim 10^{-11}$ g 내외이었다. 이 때, 비특이적 결합은 관찰되지 않았다.

히루딘과 thrombin의 결합체에 대한 항체의 중화 효과

히루딘을 코팅시키고 thrombin과 결합체를 만든 후 항체와 항원과의 반응 정도를 ELISA를 이용해 추적하였고 (정제된 IgG 역시 사용), 또한 정제된 히루딘 항체를 판에 코팅 시킨 후 히루딘을 결합시키고 thrombin 저해 효과를 발색기질인 Chromozym TH를 이용하여 실시하였다. 전자의 경우가 후자의 경우 보다 히루딘에 의한 thrombin 저해 효과가 약화되었다. (Fig. 4). 히루딘 항체가 단일군 항체가 아니기 때문에 히루딘이 항체에 결합될 수 있는 확률이 매우 낮다. 따라서, 후자의 경우가 전자보다 공간에 결합된 히루딘의 양이 적다고 판단된

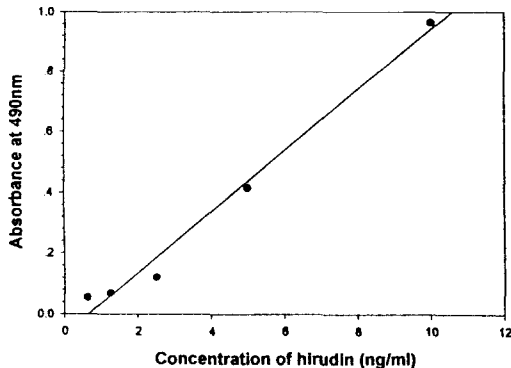


Fig. 3 — Determination of hirudin by ELISA. Antiserum of hirudin was diluted in the ratio of 1 to 1000 and HRP conjugated anti-IgG antibody was also diluted to in the ratio of 1 to 1000.

다. 공간에 코팅되었을 경우 히루딘의 항원 부위는 C-말단 부분으로 알려져 있으며²²⁾ 또한 히루딘의 thrombin과의 결합 부위는 N-말단을 포함하는 히루딘의 소수성 부분이기 때문에 서로 다르다.²³⁾ 또한, 히루딘의 C-말단의 3개의 아미노산은 트롬빈의 음이온 결합 외적부위에 결합을 한다.²³⁾ 따라서, 히루딘-thrombin의 결합에 대한 항체의 중화효과는 기대하기가 어려울 수 있다.

히루딘 항체의 정제 및 HRP의 결합

PBS완충액으로 Protein-A Sepharose column칼럼을 흘려보낸 후 0.1 M 구연산 (pH 3.0)으로 칼럼을 용출시켰을 때 나타나는 분획을 모았다. 이것을 농축하여 SDS-PAGE를 하였을 때 50 kDa (Heavy chain), 25 kDa (Light chain)의 Band가 나타나는 것으로 보아 정제된 단백질은 주로 IgG라고 생각되었다 (결과 미 기재). IgG와 HRP가 결합된 것은 직접적인 ELISA를 통해서 히루딘의 코팅양이 증가함에 따라서 흡광도가 증가함으로 확인할 수 있었다. (Fig. 5)

샌드위치 ELISA 방법을 이용한 히루딘의 정량 결합

항체와 검색 항체를 같은 종류로서 결합 항체를 판에 결합 (1:10, 1:100) 시키고 그 위에 히루딘을 결합시켰다. 같은 방법으로 ELISA를 하여 얻어진 결과는 background가 높게 나타나는 것이 관찰되었다.

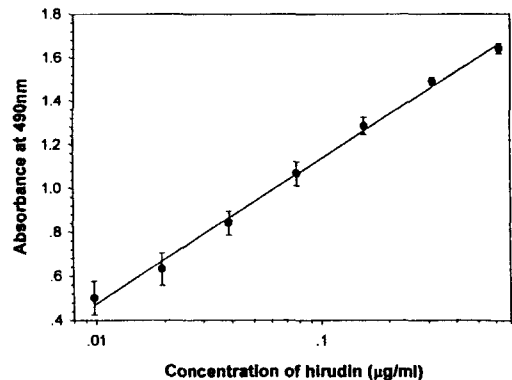


Fig. 4 — Neutralization effect of thrombin by antiserum against hirudin. —●— Capture antibody was coated onto 96 well and hirudin was overlaid overnight at 4°C. After washing the complex thrombin was incubated with a chromogenic substrate. —▲— Hirudin was coated onto 96 well and incubated with antiserum. After washing the complex thrombin was incubated with a chromogenic substrate.

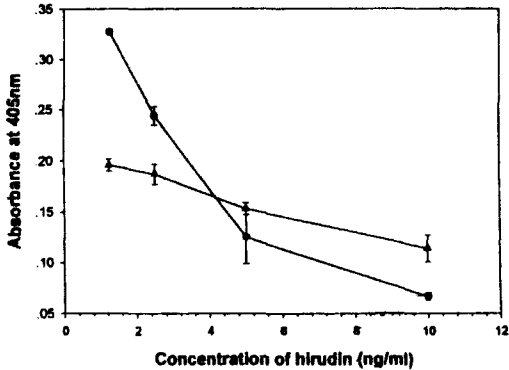


Fig. 5 — Quantitative analysis of hirudin by horseradish peroxidase-IgG conjugate. IgG was purified by ammonium sulfate precipitation and Protein-A Sepharose. Conjugation of HRP to IgG was done using periodate oxidation method.

결합 항체로 정제된 IgG를 희석 (1:200~1:12,800) 시켜 well를 코팅 시키고 히루딘을 0~20 µg/ml로 반응시킨 후의 ELISA 결과가 Fig. 6에 있다. 예상치 않은 결과는 히루딘이 낮은 농도에서 흡광도 값이 높이나 오고, 5~10 µg/ml로 코팅 시켰을 때 점점 낮아지기 시작하였다. 히루딘과 thrombin의 결합체에 대한 항체의 중화 효과 결과에서처럼 히루딘의 코팅량이 매우 적을 때는 히루딘의 결합 항체에 대해 결합할 수 있는 양이 매우 적기 때문이고 또한, 검색 항체와 결합 항체가 서로 상호작용에 의해서 background가 높이나 나타나고, 점차적으로 결합 항체에 결합된 히루딘의 양이 증가하면서 히루딘에 대한 검색 항체의 결합이 증가함에 따라서 흡광도가 높아진다고 이해할 수 있다. 히루딘과 결합 항체와의 결합 능력이 포화에 다다르면 그 이상의 히루딘에 대해서 검색 항체와 결합을 하는 것처럼 보인다. 샌드위치 방법에서 결합 항체로는 단일군 항체를 사용하는 것이 위의 결과에서 나타나는 비 특이적 상호작용을 배제할 수 있을 것이다.

결론적으로 히루딘을 carrier 단백질과 결합을 히루딘 항체를 제조할 수 있었으며 특히, -SH기를 이용하여 활성화된 maleimide에 결합시켜서 항원으로서 사용하였다. 히루딘에 대한 항체는 히루딘, 환원 히루딘 (reduced hirudin), KLH 모두에 대해서 항체가 만들어졌다. 항체를 1:1,000에서 희석시킨 후 96 well을 이용하여 히루딘의 양이 60 pg에서 1 ng 범위내에서 측정이 가능하였다. 이 경우에 background는 0.05이하이므로 히루딘에 특이성이 있음을 확인할 수 있었다. 생

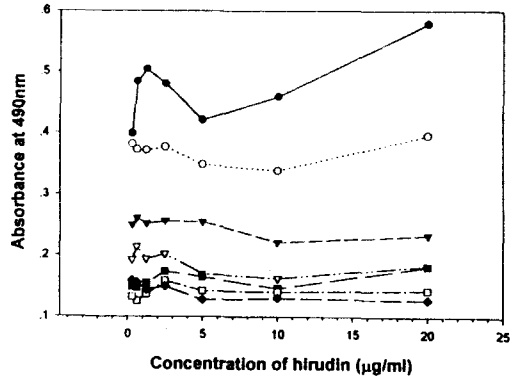


Fig. 6 — Sandwich ELISA for a detection of hirudin. Affinity-purified IgG in coating buffer was serially diluted with 2-fold dilutions starting at 1:200. Hirudin was also added by serial dilution (0~20 µg/ml). Then HRP-IgG conjugate was added to each well in the ratio of 1 to 40. Washing, blocking and incubation were done as described in Materials and Methods. —●— 1:200, —○— 1:400, —▼— 1:400, —▽— 1:1600, —■— 1:3200, —□— 1:6400, —◆— 1:12800

체내의 히루딘 정량을 위하여 직접적인 방법과 샌드위치 방법을 시도하였다. 이에 정제된 항체와 horseradishperoxidase와 화학적으로 결합시켜 현재 비교 검토하였다. 직접 방법은 별 문제가 없으나 생체내의 히루딘 정량은 샌드위치 방법이 우수할 것으로 생각되어 시도하였다. Background가 높게 나타나 히루딘에 대한 특이적 항체의 정제가 필요하게 되었고 또한 단일군 항체의 제조가 앞으로 수행되어야 한다고 판단되었다. 위의 방법을 이용하여, 히루딘에 대한 직접적인 ELISA는 박테리아의 분해물, 발효 액체액, 혼합물에서 항원 측정 등에 적용시킬 수 있을 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술처 선도기술개발사업 연구비 지원으로 수행되었기에 감사드리는 바입니다.

문헌

- 1) Markwardt, F. : Die isolierung and chemische charakterisierung des hirudins. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **308**, 147 (1957).
- 2) Fenton, J. W. : Thrombin interactions with hirudin. *Sem. Thromb. Hemostas.* **15**, 265 (1989).

- 3) Markwardt, F. : Hirudin and derivatives as anticoagulant agents. *Thromb. Haemost.* **66**, 141 (1991).
- 4) Fortkamp, E., Rieger, M., Heisterberg-Moustes, G., Schweitzer, S. and Sommer, R. : Cloning and expression in *Escherichia coli* of a synthetic DNAs for hirudin, the blood coagulation inhibitor in the leech. *DNA*, **5**, 511 (1986).
- 5) Harvey, R. P., Degryse, E., Stefani, L., Schamber, F., Cazena, J. P., Courtney, M., Tolstochev, P. and Lecocq, J. -P. : Cloning and expression of a cDNA coding for the anticoagulant hirudin from the bloodsucking leech, *Hirudo medicinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1084 (1986).
- 6) Märki, W. E., Grossenbacher, H., Grtter, M. G., Liersch, M. H., Meyhack, B., Heim, J. : Recombinant hirudin: Genetic engineering and structure analysis. *Sem. Thromb. Hemost.* **17**, 88 (1991).
- 7) Doutremepuich, C., Lalanne, M. C., Doutremepuich, F., Walenga, F., Farred, J and Breddin, H. K. : Comparative study of three recombinant hirudins with heparin in an experimental venous thrombosis model. *Haemostasis* **21** (Suppl. 1), 99 (1990).
- 8) Krupinski, K., Breddin, H. K., Markwardt, F., Haarmann, W. : Antithrombotic effects of three thrombin inhibitors in a rat model of laser-induced thrombosis. *Haemostasis* **19**, 74 (1989).
- 9) Markwardt, F., Nowak, G. and Bucha, E. : Hirudin as an anticoagulant in experimental hemodialysis. *Haemostasis* **21** (Suppl. 1), 149 (1991).
- 10) Kaiser, B., Simon, A., Markwardt, F. : Antithrombotic effects of recombinant hirudin in experimental angioplasty and intravenous thrombolysis. *Thromb. Haemost.* **63**, 44 (1990).
- 11) Nowak, G. and Markwardt, F. : Hirudin in disseminated intravascular coagulation. *Haemostasis* **21** (Suppl. 1), 142 (1991).
- 12) Kim, Y. S., Eom, E. M., Jung, C. S., Jung, K. H., Sohn, J. H., Choi, E. S. and Rhee, S. K. : Evaluation of anticoagulant activity of recombinant hirudin. *J. Appl. Pharmacol.* **2**, 166 (1993).
- 13) Spannagal, M., Bichler, H., Lill, H., and Schramm, W. : A fast photometric assay for the determination of hirudin. *Haemostasis* **21** (Suppl. 1) 36 (1991).
- 14) Walenga, J. M., Hoppensteadt, D., Koza, M., Wallock, M., Pifarre, R. and Fareed, J. : Laboratory assays for the evaluation of recombinant hirudin. *Haemostasis* **21** (Suppl.1), 49 (1991).
- 15) Stoeffler, G., Spinner, S., Scheffauer, F., Hampl, H., Maschler, R., and Fink, E. : Epitope mapping and quantitation of hirudin with polyclonal and monoclonal antibodies. *Thromb. Res. Suppl. VII*, 38 (1987).
- 16) Dawes, J., James, K., Micklem, L. R., Pepper, D. S. and Prowse, C. V. Monoclonal antibodies directed against human alpha-thrombin and thrombin-antithrombin III complex. *Thromb. Res.* **36**, 397 (1984).
- 17) Spinner, S., Stoeffler, G. and Fink, E. : Quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for hirudin. *J. Immunol. Methods* **87**, 79 (1986).
- 18) Spinner, S., Scheffauer, F., Maschler, R. and Stoeffler, G. : A hirudin catching ELISA for quantitating the anticoagulant in biological fluids. *Thromb. Res.* **51**, 617 (1988).
- 19) Schlaeppli, J.M., Vekemans, S and Chang, J. Y. : Preparation of monoclonal antibodies to hirudin and hirudin peptides. *Eur. J. Biochem.* **188**, 463-470 (1990).
- 20) Schlaeppli, J. M. : Preparation of monoclonal antibodies to the thrombin/hirudin complex. *Thromb. Res.*, **62**, 459 (1991).
- 21) Winston, S. E., Fuller, S. A. and Hurrell, G. R. : Immunology. *Current Protocols in Molecular Biology* **11** (1989).
- 22) Mao, S. J. T., Yates, M. T., Owen, T. J. and Krstenansky, J. L. : Preparation of antibodies to a synthetic C terminus of hirudin and identification of an antigenic site. *J. Immunol. Methods* **120**, 45 (1989).
- 23) Rydel, T. J., Ravichandran, K. G., Tulinski, A., Bode, W., Huber, R., Roitsch, C. and Fenton II J. W. : The structure of a complex of recombinant hirudin and human α -thrombin. *Science* **249**, 277 (1990).