

한우 초유중 Ig의 분리 · 정제 및 면역 반응에 관한 연구

백승천* · 김용휘** · 신제호*** · 유제현
건국대학교 낙농학과 · 동물자원연구센터

Studies on the Separation of Immunoglobulin and Immunological Response from Korean Native Cattle

S. C. Baick*, Y. W. Kim**, J. H. Shin*** and J. H. Yu

Department of Dairy Science, Kon-Kuk University* · Animal Resources Research Center

SUMMARY

This study was conducted to efficiently separate the Ig from Korean native cattle colostrum and to utilize them as an immunogen for the production of antibodies against rabbit. The results obtained were as follows:

1. About 84% of Ig G could be separated from Korean native cattle colostrum by gel filtration using Superose 12 column on HPLC. The separation profile of Korean native cattle colostrum immunoglobulin was similar that of Holstein colostrum Ig.
2. Separation of Korean native cattle colostrum Ig by anion exchange chromatography using Mono Q column on HPLC was poor resolution chromatographic pattern.
3. Hi-Trap Protein G column showed better results than the Protein A Sepharose CL-4B column in the Ig G binding capacity from Korean native cattle colostrum Ig.
4. Protein G Sepharose Fast Flow system resulted in higher Ig G binding capacity as the industrial size scale-up approach.
5. Sufficient titer reaction of antibody to Korean native cattle colostrum Ig G was confirmed by ELISA.

(Key words : Immunoglobulin, Gel filtration, Affinity chromatography, ELISA)

I. 서 론

모든 포유동물은 분만과 동시에 새끼에 영양 포

육을 할 목적으로 약 1주일간 초유를 분비하는데 그중에는 여러가지 다양한 생리활성물질이 함유되어 있어 모든 생리계통의 기능을 원활하게 해 주고 있다 (Butler, 1971; Larson과 Smith,

* 서울우유(협) 기술연구소
** 중부대학교 동물자원학과
*** 한국야쿠르트 중앙연구소

1974). 소의 면역글로블린은 신생우에게 단지 초유를 통한 passive immunity방법에 의하여 전달되며 특히 새끼를 낳은 후 24시간 이전의 초유에 다량의 immunoglobulin이 함유되어 있다. 일반적으로 소의 착유에서 가장 많은 면역글로블린은 G1과 G2로 구분되어지는데 특히 Ig A는 소의 초유에서 비록 적은 양이 함유되어 있으나, 젖먹이에게 미생물질병에 대한 접막에서의 방어의 역할을 하는 면역적 기능이 있다 (AL - Mashiakhi와 Nakai, 1987 ; Bezkorovainy, 1977; Butler와 Maxwell, 1972).

Solvent fraction, gel filtration, ion-exchange chromatography, affinity chromatography 등 매우 다양한 생화학적 분리기법이 조면역글로블린을 분리하기 위하여 적용되어왔다 (Brooks와 Stevens, 1985 ; Lichan 등, 1990). 그러므로 한우 초유의 면역글로블린을 1차년도에서 확립한 방법과 protein G sepharose fast flow column을 이용하여 효과적으로 분리, 정량하고 한우 초유의 immunoglobulin의 면역성을 확인하여 다양한 식품 및 대용유 등의 제조에 기능성 첨가제로 투여 후 면역성이 부여될 수 있는 가능성을 얻기 위한 연구로서 본 실험의 목적은 한우초유로부터 효과적으로 Ig G를 분리한 후 그것을 항원으로 하여 토끼에다 면역주사함으로써 특이성 있는 항체를 생산하는 데 있다.

II. 재료 및 방법

1. 공시재료

본 실험의 시료는 대관령 고냉지 시험장에서 사육되고 있는 건강한 한우의 분만 후 24시간이내의 초유를 채취하여 사용하였다.

2. 조면역글로블린의 분리

구입된 한우의 초유를 Kanamaru 등 (1982)의 방법을 응용하여 지방과 casein을 원심분리(10,000×g/30min, 4℃)와 0.1N HCl에 의한 pH조절

(pH 4.6)에 의하여 제거하고 여과와 투석의 방법에 의하여 유청단백질을 분리하였다. 이 유청단백질을 Garvey(1977)의 방법에 따라, 33% ammonium sulfate 포화용액의 처리와 원심분리(4,000×g/30min, 4℃)에 의하여 조면역글로블린을 분리하여 gel filtration, ion-exchange chromatography, affinity chromatography, protein G sepharose fast flow assay 등의 재료로서 사용하였다.

3. Gel filtration

건강한 한우의 초유로부터 33% ammonium sulfate 포화용액을 처리한 후 얻어진 crude Ig를 280nm에서 HPLC를 이용하여 Andrew 등 (1985)의 방법을 이용하여 각 Ig의 분리를 실시하였다. Gel filtration을 하기 위하여 1차년도에서 사용한 column인 superose 12 column (crosslinked agarose based column, Pharmacia LKB, Sweden)을 이용하였다. 시료는 elution buffer(0.15M의 NaCl과 0.02% NaN₃를 함유한 0.05M PBS)에 충분히 녹인 후 (2mg/ml) 100μl의 sample을 0.5ml/min의 flow rate로 주입함으로써 한우 초유의 조면역글로블린을 분리하였다. 이 실험에 사용된 HPLC system은 One LCC-5 controller, one pump 그리고 UV detector로 이루어졌다.

4. Ion-exchange chromatography

Anion exchange chromatography인 Mono Q Column(Pharmacia LKB, Sweden)을 HPLC에 부착하여 한우초유의 조면역글로블린의 분리 정도를 검토하였다. Start buffer로는 0.01M의 NaCl을 함유한 0.05M의 PBS(pH 6.7)을 사용하였고, Final buffer로는 1M의 NaCl을 함유한 0.05M의 PBS(pH 6.7)를 사용하였다. 2mg/ml의 비율로 조면역글로블린을 start buffer에 충분히 녹인 후 1ml/min의 용출 속도로 100μl의 sample을 주입함으로써 조면역글로블린의 분리를 실시하였다.

5. Affinity chromatography

한우초유의 조면역글로블린 2ml(2mg/ml)의 시료를 0.05M PBS (pH 7.2)에 투석한 후 Protein-A Sepharose CL-4B (Pharmacia LKB Biotechnology, Sweden) column에 주입하였다. Protein-A sepharose CL-4B column은 증류수로 세척한 후 0.05M PBS(pH 7.2)으로 평형화시켰다. 시료를 주입하기 전에 PD-10 column을 이용하여 시료 중 NaCl성분을 제거하였다. 시료를 5회 이상 반복 주입하여 Ig G가 잘 부착되도록 한 다음 0.05N PBS로 column을 washing하였다. 흡착된 Ig G를 용출하기 위하여 1M acetic acid(pH 4.0)을 column에 통과시켜 tube 당 2ml씩 채취하여 UV spectrophotometer(280nm)에서 흡광도를 측정하였다. Ig G를 조면역글로블린으로 분리하기 위한 다른 affinity chromatography 방법으로 6% cross-linked agarose로 충전된 Hi-trap protein G (Pharmacia LKB Biotechnology, Sweden) column을 사용하였다. Start buffer로는 0.02M의 PBS(pH 7.0)을, elution buffer로는 0.1M의 glycine-HCl(pH 2.7)을 사용하였다. Column을 평형화하기 위하여 buffer의 용출속도를 4ml/min로 적용하였고, 조면역글로블린으로 부너 Ig G를 분리하기 위하여 2ml/min의 용출속도를 적용하였다. 2ml(2mg/ml)의 시료를 주입한 후 tube당 2ml씩 채취하여 UV Spectrophotometer(280nm)에서 흡광도를 측정하였다.

6. Protein G sepharose fast flow system

한우 초유의 조면역글로블린으로 부터 Ig G의 대량 분리 정제하기 위하여 Protein G Sepharose Fast Flow column(16×20, 5mg of protein G sepharose)을 HPLC에 부착하여 사용하였다. Start buffer로는 0.02M의 PBS(pH 7.0)을, elution buffer로는 0.1M의 glycine-HCl(pH 2.7)을 사용하였다. Ig G에 대한 binding능력을 평가하기 위하여 시료 주입량을 5, 10, 15, 20mg으로 증

가시켜 0.02M의 PBS용액에 녹인 후 column에 주입함으로써 Ig G의 결합능력을 비교하였다.

7. Immunodiffusion assay

2%의 Agarose를 0.05M의 Barbital buffer(pH 8.6)에 녹인 후 gel을 petri dish에 높이 1.5mm가량이 되도록 하였다. Petri dish상의 gel 판에 둥근 홈을 만든 후 중심에는 항체를, 주위의 홈에는 affinity chromatography에서 얻어진 fraction을 항원으로 하여 분획을 검증하였다.

8. Immunization and ELISA

Affinity chromatography 에서 분획된 Ig G를 약 200 μ g/ml을 취하여 Complete Freund's Adjuvant (Sigma, U.S.A.)와 1ml이 되도록 1:1의 비율로 혼합하여 토끼(2kg)의 등에 20여군데 피하 주사하였다. 항체 촉진 주사는 이주일 간격으로 6회 실시한 후 항체 생성 유무를 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)의 방법에 의하여 측정하였다. ELISA방법에 의한 항체 확인은 Wie등(1982), Kenedy등(1985)의 방법을 사용하였다. Affinity chromatography에서 분획된 Ig G를 ELISA판에 30 μ g씩 (0.15ml/well) 충분히 coating이 되도록 분주하고, 1%의 bovine serum albumin 으로 blocking시켰다. 면역 주사되지 않은 토끼에서 뽑은 normal rabbit serum과 면역 주사된 토끼에서 뽑은 serum을 각각 1:100 부터 두배 희석법으로 1:128,000까지 희석하여 150ml씩 각 well에 분주하였다. Conjugate로는 goat anti-rabbit Ig G-HRP(Sigma, U.S.A.)를 1:1,000으로 희석하여 150ml씩 분주함으로써 2nd antibody로 사용하였고 substrate로는 OPD(O-phenyldiamine, Sigma, U.S.A.)를 사용하였다. 각 단계마다 0.05M의 PBS(pH 7.2)로 3회 반복하여 washing을 하였으며 판독은 Microplate Autoreader (Biotek Ins. U.S.A.)를 이용하여 490nm 에서 흡광도를 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

본 실험에서는 1차년도에서 확립한 여러 생화학 적 방법을 이용하여 한우초유의 조면역글로블린 으로 부터 각 Ig를 효과적으로 분리를 피하여 특 히 초유의 면역글로블린 중 많은 함량을 차지하고 있는 Ig G를 신속하고 효과적으로 분리하여 이를 토끼에 Immunogen으로서 면역 주사한 후 그것에 대한 항체생성 유무를 측정하였다.

1. Superose 12를 이용한 Ig의 분리

한우초유에서의 유청단백질을 33% ammonium sulfate 포화용액으로 처리한 후 얻어진 조면역글 로블린을 0.01M의 PBS(pH 7.2)에서 48hr 투석 한 후의 sample을 Superose 12 column을 이용하 여 gel filtration한 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

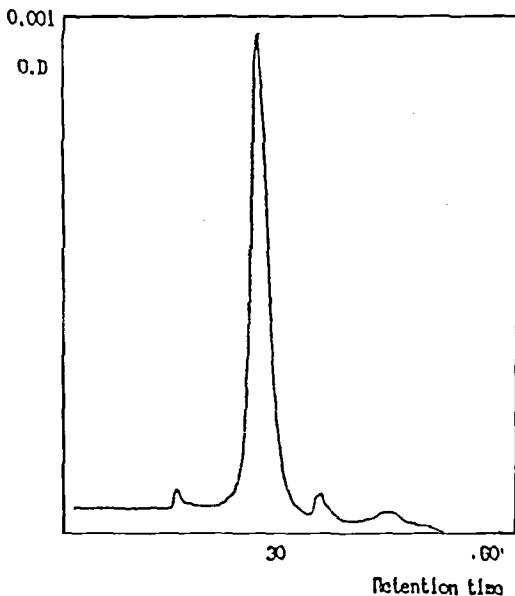


Fig. 1. Separation profile of Korean native cattle colostral Ig by gel filtration(Superose 12) on HPLC. Equilibration and elution buffer: 0.05M PBS. Flow rate of 0.5ml/ min.

Fig. 2에서 보여지는 것처럼 모두 4개의 분획으 로 분리되었는데 두번째의 분획으로 나타내는 Peak가 standard bovine Ig G와의 retention time을 비교하여 본 결과 Ig G로 확인할 수 있었 으며 5회 반복하여 실험한 결과 이 분획이 차지하 는 비율이 전체의 조면역글로블린 중 약 84%를 차지하는 것으로 나타났다. 이것은 1차년도 결과 인 Holstein 초유의 Ig G의 함량보다도 다소 적은 것으로 나타났다. 일반적으로 한우초유 중의 조면 역글로블린의 분리정도가 Holstein초유의 조면역 글로블린과 유사하게 분리되는 것으로 나타났다. Potter와 Noakes(1970)이 Sephadex G-200을 이 용하여 Ig G와 Ig A를 순수 분리할 수 없다고 보 고하였는데, 본 실험에서는 Superose 12 column 을 이용하여 한우초유의 조면역글로블린에서 각 각의 peak가 확실하게 분리되는 결과를 얻었다. 그러므로 조면역글로블린의 분리능력에 대해서는 Superose 12 column이 sephadex G-200보다도 우수하다고 볼 수 있으므로 한우초유의 crude Ig 분리를 위한 gel filtration에 적합한 것이라 사료 된다.

2. Mono Q Column을 이용한 Ig 분리

Anion-exchange column인 Mono Q를 HPLC 에 부착하여 조면역글로블린의 분리정도를 나타 낸 결과가 Fig. 3에 나타나 있다. Fig. 2에서 나타 난 것 처럼 10분까지의 retention time에서는 분 리 정도가 잘 나타나 있는데 그 이후에서 peak가 매우 broad하게 나타나 있다. Holstein 초유 중의 조면역글로블린을 이용했을 때 AUFS를 0.5로 고 정시켰을 때는 모두 4개의 분획으로 분리되는 결 과를 얻었는데 한우 초유인 경우 그 분리 정도가 매우 좋지 않은 것으로 나타났다. Ion-exchange column을 사용했을 경우, gel filtration을 이용했 을 때보다 짧은 시간에 분리할 수 있지만 이 경우 에서는 분리능력을 보았을 때 gel filtration방법 이 더 효과적인 것으로 사료된다.

3. Affinity chromatography에 의한 Ig G분리

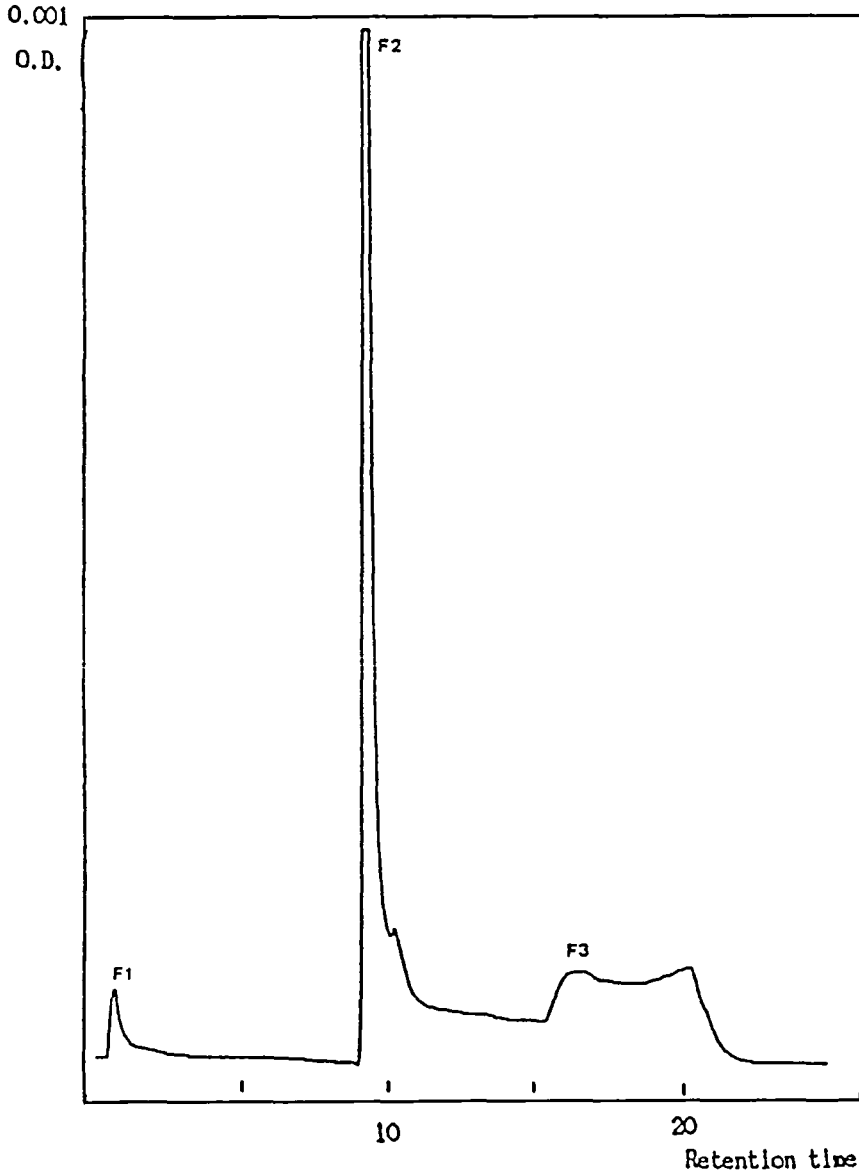


Fig. 2. Chromatographic pattern of Korean native cattle colostrum Ig by anion-exchange chromatography (Mono Q) on HPLC.

Buffer A: 0.05M PBS with 0.01M NaCl Buffer B: 0.05M PBS with 1M NaCl. Flow rate of 1ml/min.

Ig G와 결합 친화력이 있는 protein A sepharose CL-4B column과 Hi-trap protein G column을 이용하여 한우초유의 조면역글로블린

으로 부터 Ig G의 결합정도를 조사하였다. Protein A Sepharose CL-4B column에서는 주로 3,4 번 fraction tube에서 Ig G가 분리된 것으로 나타

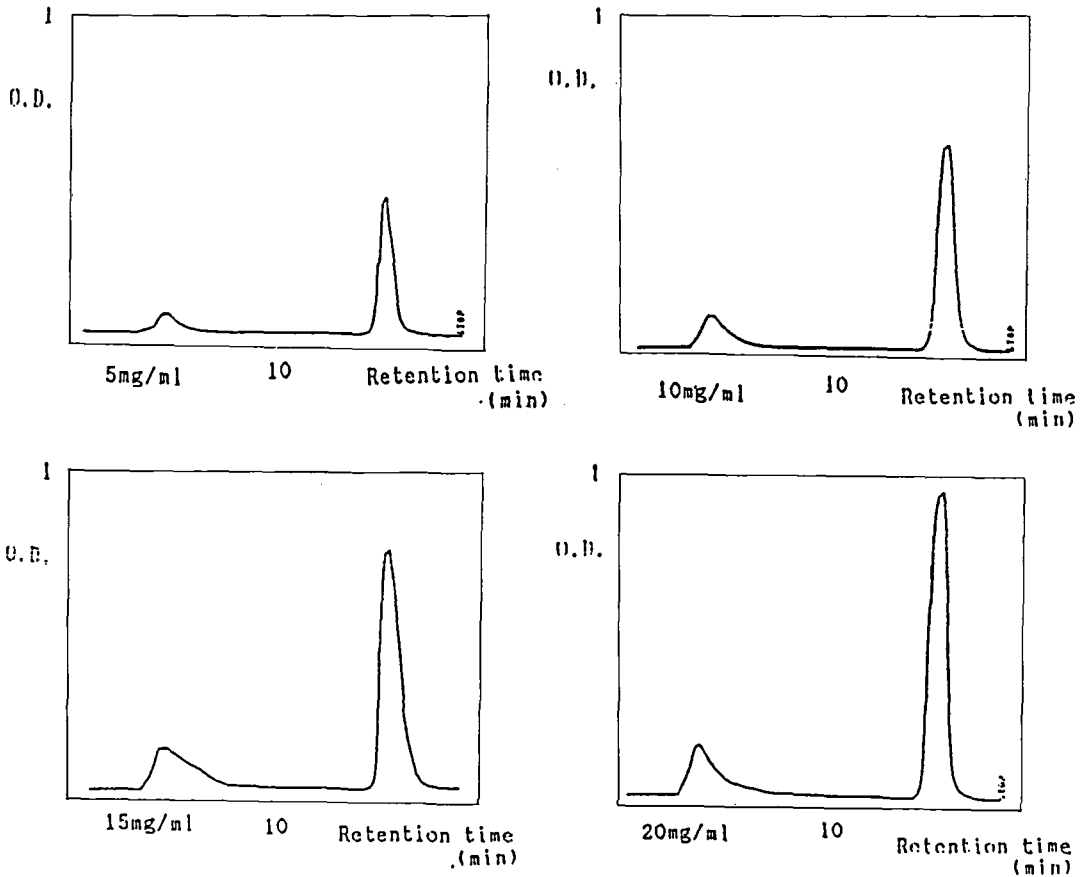


Fig. 3. Chromatographic separation pattern of Ig G from Korean native cattle colostrum crude immunoglobulin by Protein G Sepharose Fast Flow system (5ml in gel volume).

Equilibrating buffer: 0.02M PBS(pH 7.0). Elution buffer: 0.01M glycine-HCl(pH 2.6).

났고 Hi-trap protein G column에서는 주고 4, 5 번 fraction tube에서 Ig G가 분리 결합된 것으로 나타났다. Ig G의 결합능력을 optical density 값으로 비교하여 보면 Hi-trap protein G column이 protein A Sepharose CL-4B column 보다 훨씬 높은 것으로 나타나 Hi-trap protein G column이 조면역글로블린 중 Ig G의 결합에서 우수하다고 사료된다. Table 1에 나타난 OD 값은 모두 4회 반복 실험하여 얻어진 평균 값을 나타낸 것이다. 두 Affinity chromatography에서 Holstein초유 중의 Ig G 및 한우초유 중의 Ig G의 결합능력을 비교하여 보면 Holstein초유 중의 Ig G의 결합능력이 한우초유 중의 Ig G의 결합능력보다 뛰어난 것

Table 1. Ig G binding ability of Korean Cattle colostrum between Protein A CL-4B and Hi-Trap Protein G Column

Fc. # column	Protein A CL-4B	Hi-trap Protein G
1	-0.007	-0.014
2	0.022	-0.007
3	0.140	0.027
4	0.428	0.417
5	0.077	0.631
6	-0.016	0.084
7	-0.016	-0.040

*All numbers are O,D value at 490nm

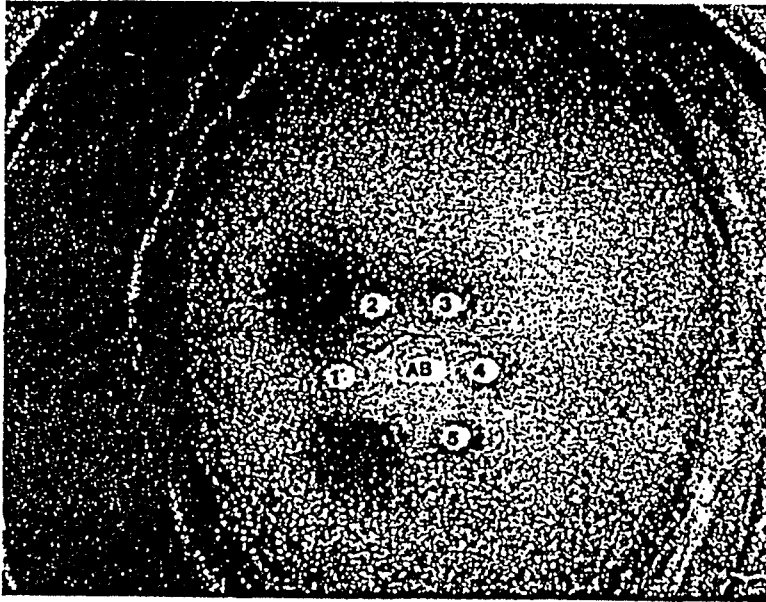


Fig. 4. Immunodiffusion assay of various fractions from column work and affinity chromatography .

AB: Rabbit anti-bovine Ig G

AG: 1. Unbounded Fc. of Hi-trap Protein G

2. Bounded Fc. of Hi-trap Protein G

3. Fc. 2 of gel filtration column

4. Fc. 1 of anion-exchange chromatography

5. Fc. 2 of anion-exchange chromatography

6. Fc. 3 of anion-exchange chromatography

을 알 수 있었다. Fig. 4에서는 Protein G Sepharose Fast Flow column을 이용하여 한우 초유 중 조면역글로블린에서 Ig G의 결합능력을 나타내고 있다. 5mg의 조면역글로블린부터 20mg까지의 분리 정도를 나타내고 있는데 20mg까지도 Ig G가 충분히 분리 결합되는 것을 알 수 있다. 그 이상의 양, 즉 30mg의 sample을 injection하면 분리가 잘 되지 않은 결과를 얻었다. Industrial size로 column을 scale-up하게 되면 충분히 Ig G를 대량분리할 수 있는 것으로 사료된다. Table 2에서는 분리된 Ig G를 정량한 결과를 나타내고 있다. 즉, 한우 초유의 조면역글로블린 20mg을 Protein G Sepharose fast flow system으로 분리하게 되면 ml당 약 1.25mg의 Ig G를 얻을 수 있었

다. Fig. 4의 immunodiffusion assay결과 Ig G의 항체와 affinity chromatography에 의하여 얻어진 bound된 분획과 서로 띠를 형성하는 항원항체

Table 2. Total Korean Cattle colostrals Ig G binding capacity by Protein G Sepharose 4 fast flow column (5ml in gel volumn)

Sample injection volumn (mg / ml)	Total Ig G binding Capacity* (mg / ml)
5 mg	0.65
10 mg	0.81
15mg	0.93
20 mg	1.25

* Average of 2 replications

Table 3. Korean Cattle colostrum Ig G antibody titer reaction by ELISA

Rabbit Serum Ab. dilution	Immunized serum	Normal serum
1 : 100	0.94	0.32
1 : 200	0.90	0.34
1 : 400	0.90	0.28
1 : 800	0.85	0.26
1 : 1,600	0.85	0.20
1 : 3,200	0.80	0.18
1 : 6,400	0.80	0.18
1 : 12,800	0.72	0.16

반응이 생겼으므로 bound된 분획이 Ig G라고 사료된다.

4. ELISA방법에 의한 항체반응

Protein G Sepharose fast flow system에서 얻어진 Ig G를 항원으로 하여 토끼에 면역화 주사함으로써 한우초유의 Ig G에 대한 항체생성유무를 ELISA방법에 의하여 측정된 결과가 Table 3에 나타나 있다. 면역화된 토끼와 정상토끼의 혈청을 채취하여 항체생성유무를 측정하였는데, 면역화된 토끼의 혈청에서 충분한 양의 항체가 생성되었음을 알 수 있다.

IV. 적 요

본 실험에서는 한우초유를 33% ammonium sulfate 포화용액으로 처리하여 조면역글로블린을 얻은 후 gel filtration, ion-exchange chromatography를 이용하여 조면역글로블린의 분리 정도를 조사하고 affinity chromatography column을 이용하여 조면역글로블린으로부터 Ig G의 결합 정도를 알아보고 Protein G Sepharose fast flow system을 이용하여 신속하게 대량으로 Ig G의 분리를 피하여 얻어진 Ig G를 이용하여 ELISA방법으로 항체 생성유무를 측정하였으며,

그 결과는 다음과 같다.

1. HPLC상에서 Superose 12 column을 이용하여 한우초유의 조면역글로블린을 분리한 결과 Holstein초유의 조면역글로블린과 유사한 분리 정도를 나타냈지만 약 84%의 Ig G를 한우초유의 조면역글로블린으로부터 분리할 수 있었다.
2. Mono Q를 이용하여 HPLC에서 한우초유의 조면역글로블린을 gel filtration방법보다 짧은 시간에 분리할 수 있었지만 그다지 분리 정도가 좋지 않은 것으로 나타났다.
3. Hi-trap protein G column이 protein A sepharose CL-4B column보다 더 많은 양의 Ig G를 한우초유의 조면역글로블린으로부터 얻을 수가 있었다.
4. Protein G Sepharose fast flow system을 이용하여 20mg의 sample양을 주입하여도 충분히 Ig G를 분리할 수 있었으며, ml 당 약 1.25mg의 Ig G를 얻을 수가 있었다.
5. ELISA방법을 이용하여 한우초유의 Ig G에 대한 항체 생성 유무를 측정된 결과, 면역화된 토끼에서 정상 토끼의 혈청에서보다 titer가 높게 나타났으므로 항체생성이 확인되었다.

V. 참고문헌

1. Al-Mashiakhi, S. A. and S. Nakai. 1987. Isolation of bovine immunoglobulin and lactoferrin from whey proteins by gel filtration techniques. J. Dairy Sci. 70:2486.
2. Andrew, A. T., M. D. Taylor and A. J. Owen. 1985. Rapid analysis of bovine milk proteins by Fast Protein Liquid Chromatography. J. Chromatography. 348:177.
3. Bezkorovainy, A. 1977. Preparation of bovine immunoglobulin and free secretory component and their specific antibodies. J. Dairy Sci. 55:151.
4. Brooks, T. L. and A. Stevens. 1985. Preparation HPLC purification of IgG and Ig M monoclonal antibodies. Am. Lab. 10:54.

5. Butler, J. E. 1971. Review of bovine immunoglobulins. *J. Dairy Sci.* 54:1315.
6. Butler, J. E. and C. F. Maxwell. 1972. Preparation of bovine immunoglobulins and free secretory component and their specific antisera. *J. Dairy Sci.* 55:151.
7. Gavary, J. S., M. E. Cremer and D. H. Susdrop. 1977. *Methods in immunology*. Benjamin Inc. p 218.
8. Kanamaru, Y., Y. Kuzuya and T. Tanahashi. 1982. Purification of secretory Ig A from bovine colostrum. *Agri. Biol. Chem.* 46:1531.
9. Kenedy, D. M., R. Verbanek, D. Samuel and D. Richards. 1985. Increased sensitivity and specificity of a sandwich ELISA for measurement of Ig E antibodies. *J. Immunol. Methods.* 78:217.
10. Larson, B. L. and V. R. Smith. 1974. *Lactation*. Vol III. Academic Press p 217-247.
11. Li-chan, E., L. Kwan, and S. Nakai. 1990. Isolation of immunoglobulins by competitive displacement of cheese whey proteins during Metal Chelate Interaction Chromatography. *J. Dairy Sci.* 73:2075.
12. Potter, P. and D. E. Noakes. 1970. Immunoglobulin Ig A in bovine serum and external secretions *Biochem. Biophys. Acta.* 214:107.
13. Wie, S., K. J. Dorriton and A. Froose. 1978. Characterization of the proteolytic fragments of bovine colostrum Ig G1. *J. Immunol.* 121:98.