

계육 특이항체를 이용한 원료육 단백질의 검색

황보 식 · 임태진* · 정구용

상지대학교 동물자원학과, *낙농자원식품학과

Identification of Chicken, Pork and Beef Meats by Chicken Specific Antibody

S. Hwangbo, T. J. Rhim* and K. Y. Chung

Department of Animal Sciences, *Dairy and Food Sciences, Sanji University

Abstract

Chicken, beef, pork meats and isolated soy protein (ISP) were heated at 100°C for 30min and then heat-resistant proteins were fractionated to examine cross-reactivity with polyclonal antibody against chicken meat. The polyclonal antibody reacted specifically with heat-resistant protein from chicken meat, but not with beef, pork or ISP. Dot blotting using the polyclonal antibody showed that the sensitivity for detecting chicken meat was 1 µg and antibody-antigen reaction was dose-dependant. Results of dot blotting analysis to compare the amount of chicken meat present in market meat products (Kentucky Frank sausage; chicken meat 46.52% and pork 24.92% vs Bulgogi Ham; chicken meat 28.89% and turkey 31.44%) showed that the significant differences between two meat products in terms of chicken meat concentrations. Dose-dependant dot-blotting reaction was also observed in chicken meat samples with various dilution.

Key words : ELISA, polyclonal antibody, Dot blot.

서 론

동물의 종이나 품종의 구별은 외형적 특징인 모색이나 체형 등 표현형에 의존하는 것이 가장 일반적인 방법이지만 도축하여 가공제품 형태로 전환되면 원료육의 판별은 거의 불가능하게 된다. 따라서 오래 전부터 외국에서는 다양한 육자원 및 원료육으로 부터 축종 및 품종 감별에 관해 지대한 관심을 가지고 많은 연구가 진행되어져 왔다⁽¹⁻⁴⁾.

그 동안 축육자원의 축종 판별을 위한 기술로서 관능적 검사법, 혈청학적 검사법⁽⁵⁾, 이화학적 검사법⁽²⁾, 생화학적 검사법 및 면역학적 방법^(3, 4) 등이 개발되어 왔고, 특히 면역학적 방법 중 복합항체 (polyclonal antibody)를 이용한 면역효소측정법 (ELISA)과 등전점 전기

영동기법을 이용한 단백질 전기영동 방법이 축종판별에 비교적 정확도가 높은 방법으로 사용되어졌다⁽⁶⁻⁸⁾. 면역 분석법은 특정 단백질 항원에 대한 특이성을 가지고 있는 항체를 사용하여 임신 진단 또는 병의 감염 여부를 알아내는 진단법으로 이용되어 왔다. 항원-항체 반응의 기본 기전이 항원에 존재하는 항원 결정기 (epitope)에 대한 항체의 인식에 의한 결합반응이라는 것을 착안하여, 항원의 변성이 항원 결정기의 구조적 변화를 야기시키고 이런 구조적 변화에 대한 항체의 인식정도를 결합반응으로서 나타낼 수 있다⁽⁸⁾. 그러므로 변성된 단백질과 그의 항체는 결합 반응 정도가 비 변성 단백질보다는 더 낮게 나타나게 되며 이 원리를 이용하여 변성도를 측정할 수 있다⁽⁹⁻¹²⁾. 또한, 변성된 단백질에 대한 결합성은 변성시킨 성분에 대한 항체를 생산하여 같은 조건에서 이러한 항원을 검출한다면, 항원의 변성도 뿐만 아니라 변성된 원료육 중에 함유되어 있는 특정

Corresponding author : Sik Hwangbo, Department of Animal Sciences, Sangji University, San 41, Woon-san-Dong, Wonju-Si, Kangwon-Do, Korea

성분의 검출도 용이하게 수행할 수 있으리라 사려된다.

그러나 국내에는 항체를 이용한 축육 단백질 을 식별하는 연구가 매우 미흡한 상태이며, 그 응용사례도 적은 실정이다. 또한, 일반적으로 사용되고 있는 항체는 복합항체로써, 역가가 높더라도 그 특이성이 낮아 이를 해결하기 위한 면역 흡착이나, 비특이적인 결합을 하는 항원결정기를 blocking할 필요가 있다. ELISA 에 의한 정량법을 개발하기 위해서는 quality control이 필요하며⁽¹³⁾, 이를 kit화하기 위한 기술 개발도 어려운 것이 현실적인 문제로 대두되고 있다.

따라서 본 연구에서는 축육제품에 혼입되어 있는 특정 성분을 검색하기 위한 방법을 개발하기 위하여 실시하였다. 또한, 내열성 계육 단백질에 대한 특이항체를 생산하여 축육제품 중에 혼입되어 있는 계육의 함량을 검증하였으며, 시중에 유통되고 있는 계육 혼합 육제품 및 계육의 함량을 달리한 소시지를 직접 제조하여 가열 육제품 중에 함유되어 있는 계육의 검출법을 모색하였다.

재료 및 방법

공시료

계육의 경우 일반적인 브로일러종으로써, 도축한 후 24시간 이내의 신선한 육으로 평균 도체 지육 중량이 1 kg 미만인 것을 구입해서 사용하였으며, 한우육 및 돈육 시료는 품종별 각각 10두씩 도축장에서 300g을 구입하여 단백질 추출용 시료로 사용하였다. ISP는 천양교역(주)으로부터 구입하여 사용하였다. 유통되고 있는 시중 육제품은 원주시내의 슈퍼마켓에서 구입하여 사용하였으며, 계육 함량별 가열 혼연소시지는 건국축산식품(주)에서 제조하여 사용하였다.

단백질 추출

수용성 단백질은 황보와 정⁽¹⁴⁾의 방법을 이용하여 추출하였다. 육제품의 경우, 2 mM PMSF, 0.02% NaN_3 을 함유한 증류수 12 ml 에 육제품을 3g씩 첨가하여 4°C에서 1분간 균질(Ultraturrax T25, Germany, 24,000 rpm)한 후, 4°C에서 7,500×g로 15분간 원심분리하

였다. 분취한 상등액을 100°C에서 15분간 가열한 후, 그 상등액을 이용하여 육 단백질 혼합물, 또는 육제품중에 함유된 계육의 양을 검증하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 법⁽¹⁵⁾을 보완한 Markwell 법⁽¹⁶⁾을 사용하였으며, 표준 물질은 BSA (Sigma Chemical Co., USA)를 사용하였다.

SDS-PAGE분석

SDS-PAGE분석은 Leammli의 방법⁽¹⁷⁾을 이용하였으며, acrylamide와 bisacrylamide의 농도는 37 : 1로 하였다. 분리 겔의 농도는 9% ~ 15%, 농축 겔은 3%를 사용하였으며, 전기영동에 의해 분석한 단백질은 2.5% CB로 염색한 후, 45% 메탄올의 탈색용액($\text{CH}_3\text{OH} : \text{CH}_3\text{COOH} : \text{D.W.} = 45 : 10 : 45$)으로 탈색하였다.

내열성 단백질의 조제 및 항체의 생산

원료육 및 계육혼합 축육제품으로부터 상법에 의해 추출한 수용성 단백질을 100°C에서 30분간 가열한 후, 4°C에서 7,500×g, 15분간 원심분리하였으며, 분취한 상등액을 항원으로 사용하였다.

New Zealand White Rabbit (2.5 kg, ♀)의 복강 피하 내에 내열성 계육 단백질을 면역하였으며(2 mg / 500 μl , PBS : complete Freund's adjuvant = 1:1), 1차면역 2주일 후, 1차면역과 동일한 양의 항원을 PBS에 녹인 후 incomplete Freund's adjuvant와 1:1로 혼합하여 복강 피하 내에 면역하였다. 1주일 후, 2차면역과 동일한 방법으로 항원을 주사하였으며, 1주일 후에 혈액을 채취하여 3,000 rpm / 10min 원심분리하여 얻은 항혈청을 사용하여 분석하였다.

Immunoblotting과 dot blotting

계육을 SDS-PAGE로 분리한 후, semi-dry blotting장치(Bio-Rad, USA)를 사용하여 PVDF막에 blotting하였다⁽¹⁸⁾. Blotting한 PVDF막에 1차 항체로서 anti-chicken serum을 넣어 37°C / 1.5 hr반응시켰다. PBS-Tween을

이용하여 10분 간격으로 3번 세척하였다. PBS-Tween으로 1,000배 희석시킨 HRP-conjugated anti-rabbit IgG를 2차항체로 사용하여 37°C /1.5hr 반응시킨 후, 0.01% H₂O₂와 0.05% diaminobenzidine을 함유한 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)를 기질 용액으로 사용하여 계육 표지 단백질과의 특이성을 검증하였다.

원료육 및 육제품으로부터 추출한 내열성 단백질을 이용하여 dot blotting을 실시하였다⁽¹⁹⁻²¹⁾. PVDF막을 넣은 Bio-Dot™ (Bio-Rad사)에 시료를 첨가한 후, 진공펌프를 이용하여 농축하였으며, 1% 젤라틴을 이용하여 실온에서 30분간 blocking하였다. Blocking한 PVDF막을 immunoblotting의 방법과 동일하게 항체와 반응시킨 후, 시료 중에 함유되어 있는 계육을 검증하였다.

육제품의 제조

계육, 돈육, 그리고 우육제품의 원료육 및 부재료의 구성 배합비는 Table 1과 같다. 조제한 육 혼합물은 천연 양장케이싱에 충전한 후, 55°C에서 30분간 건조, 60°C에서 20분간 훈연, 그리고 80°C에서 15분간 가열하는 등의 조건으로 소시지 제품을 만들었다.

결과 및 고찰

축종별 내열성 단백질의 추출

계육, 우육, 돈육을 75, 80, 90, 그리고 100°C

Table 1. Formula of frankfurter sausage with chicken, Hanwoo and pork meat

C : B (%)*	C : P (%)*	Formula(%)
100 : 0	100 : 0	Meat : 64
50 : 50	50 : 50	Fat : 18
30 : 70	30 : 70	Ice : 18
10 : 90	10 : 90	NPS : 1.6
5 : 95	5 : 95	Phosphate : 0.25
3 : 97	3 : 97	MSG : 0.05
1 : 99	1 : 99	Sugar : 0.7
0 : 100	0 : 100	

* C, chicken meat; B, Hanwoo meat; P, pork meat

로 가열한 후, 내열성 단백질의 양을 측정된 결과, 돈육이 열에 대하여 가장 민감한 반응을 나타내는 것으로 나타났다(Table 2). 또한, 100°C로 가열할 경우, 계육은 약 77%, 우육은 약 83%, 그리고 돈육은 약 91%가 열변성되어 침전하는 것으로 나타났다. 80°C 및 100°C로 가열한 계육, 우육, 그리고 돈육을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 80°C에서는 계육, 우육, 그리고 돈육의 내열성 성분이 거의 유사한 것으로 나타났으나(Fig. 1, A, lanes 5-7), 100°C에서 30분간 가열한 계육의 경우, 고분자의 내열성 성분이 많이 잔존하고 있는 것이 확인되었으나(Fig. 1, B, lane 5), 우육 및 돈육의 경우 계육에서 확인된 성분은 검출되지 않았다(Fig. 1, B, lanes 6 and 7). 따라서 본 실험에서는 100°C에서 30분간 가열한 후, 분획한 내열성 계육단백질을 항원으로 사용하였으며, 원료육 및 축육제품은 분석하기 전에 100°C에서 30분간 가열한 후 사용하기로 하였다.

계육 특이항체의 생산

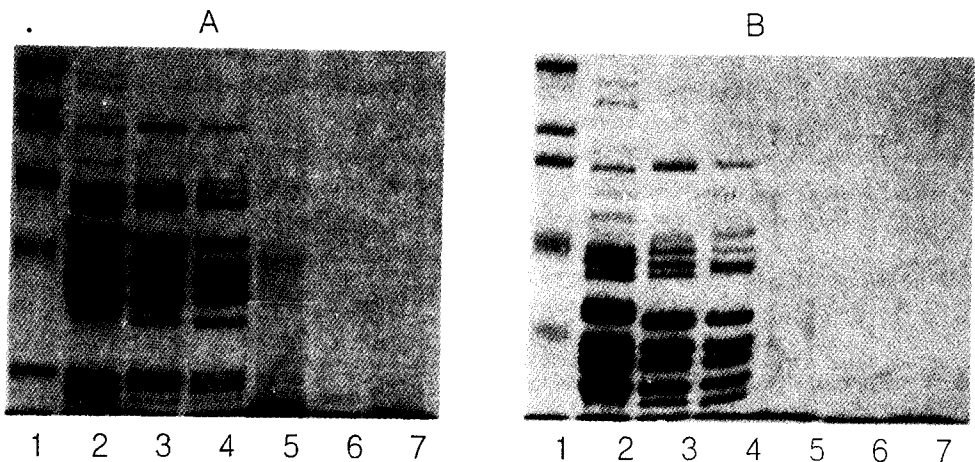
100°C에서 30분간 가열한 후 분획한 내열성 계육 단백질을 3회에 걸쳐 면역한 후, 그 혈액을 채취하여 조제한 항혈청을 이용하여 계육에 대한 역가 및 특이성을 검증하였다. ELISA에 의해 그 역가를 검사한 결과, 면역한 3마리의 토끼에서 모두 높은 역가가 확인되었다(결과 나타내지 않았음). 가열 축육의 계육 복합항체에 대한 교차반응을 immunoblotting을 이용하여 조사한 결과, 계육 복합항체는 80°C 및 100°C로 가열한 계육의 내열성 단백질과 특이적으로 반응하였으나, 우육 및 돈육과는 그 반응성이 거의 없었으며(Fig. 2, A and B), 이러한 결과는 황보와 정⁽¹⁴⁾에 의해 보고한 것과 유사한 결과를 나타내었다. 본 연구에서 이용한 항체가 복합항체인 관계로 빚어지는 ELISA의 quality control의 문제점과 immunoblotting에 의한 제한적인 검증량⁽¹³⁾을 극복하고, 보다 간편하면서 현장 적용이 가능한 dot blotting을 이용하여 계육 혼합물 및 계육 혼합육제품 중에 혼입되어 있는 계육의 검증을 모색하기로 하였다.

Dot blotting에 의한 계육의 검증

계육 복합항체를 이용하여 dot blotting을

Table 2. Extraction amounts of chicken, pork and Hanwoo meat by heated at 75°C to 100°C for 30min

	Heating tem. (°C)	Before heating (mg)	After heating (mg)	Recovery (%)
Chicken	75	10	3.33	33.3
	80		2.89	28.9
	90		2.65	26.5
	100		2.25	22.5
Pork	75	10	1.11	11.1
	80		1.08	10.8
	90		0.95	9.5
	100		0.86	8.6
Hanwoo	75	10	3.47	34.7
	80		2.87	28.7
	90		2.36	23.6
	100		1.69	16.9

**Fig. 1. SDS-PAGE patterns of chicken, Hanwoo and pork meats.**

Meat samples were heated at 80°C (lanes of 5 to 7 of A) and 100°C (lanes 5 to 7 of B) for 30min. Lanes 1, molecular weight markers from the top to the bottom; myosin heavy chain (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), egg albumin (45 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa); 2, 5, chicken meat; 3, 6, Hanwoo meat; 4, 7, pork meat. 20 μ g of soluble and heated protein were loaded per well.

실시한 결과, 계육의 검출한계는 1 μ g/well이었으며(Fig. 3, lane A, 7), 이러한 검출강도는 계육의 함량에 대하여 의존적이었다(Fig. 3, lanes A). 그러나, 이러한 검출강도는 ELISA에 비하여 매우 낮은 것이지만, 분석의 간편성

및 정성적 분석을 추구할 경우 충분한 검출강도라 생각되어, 시중 육제품 및 제조한 소시지를 이용하여 그 타당성을 검토하였다.

일반적으로 계육을 이용한 육제품의 경우, 혼입되는 단백질원은 우육, 돈육, 또는 ISP인

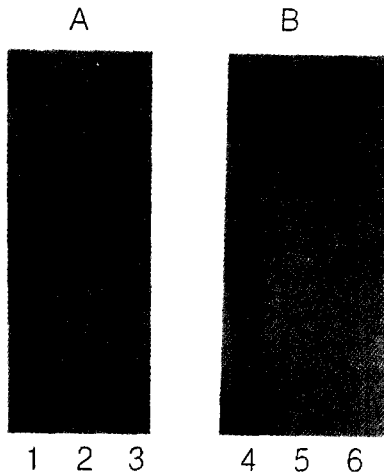


Fig. 2. Immunoblotting patterns of heated chicken, pork and beef meats with chicken polyclonal antibody.

Meat samples were heated at 80°C (A) and 100°C (B) for 30min.

Lanes 1, 4, chicken meat; 2, 5, pork meats; 3, 6, beef meat. Charged protein amounts were 15 µg/well.

관계로, 이러한 단백질과 복합항체와의 교차반응을 검사하였다. 그 결과, 계육 복합항체는 돈육 및 ISP와 비특이적 교차반응을 일으키고 있는 것이 확인되었다(Fig. 3, lanes B, C and D). 이러한 교차반응을 줄이기 위하여 PVDF

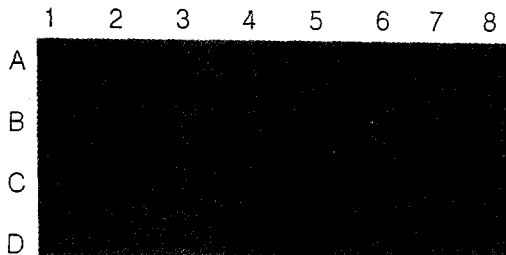


Fig. 3. Dot blotting patterns of antigen-antibody reaction with chicken polyclonal antibody.

Lanes A, chicken meat; B, pork meat; C, Hanwoo meat; D, isolated soy-protein (ISP). PVDF membrane was blocked with 1% BSA. Charged amounts was 20, 10, 8, 6, 4, 2, 1 and 0.8 µg per well from 1 to 8. Antigens were heated at 100°C for 30min.

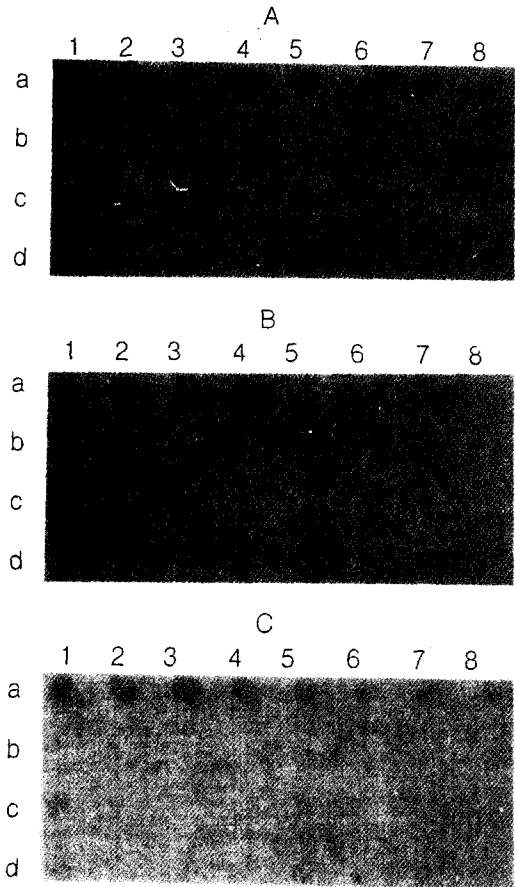


Fig. 4. Dot blotting patterns of antigen-antibody reaction with chicken polyclonal antibody.

PVDF membranes were blocked with 1% gelatin (A), 1% whey protein (B) and 2% FCS (C). Lanes a, chicken meat; b, isolated soy-protein (ISP); c, pork meat; d, Hanwoo meat. Lanes 1, chicken meat; 2, ISP; 3, pork meat; 4, Hanwoo meat. Charged amounts were 20, 10, 8, 6, 4, 2, 1 and 0.8 µg per well from 1 to 8. Antigens were heated at 100°C for 30min.

막에 단백질을 blotting한 후, blocking제의 종류를 다르게하여 dot blotting을 실시한 결과, 1% 젤라틴에 의하여 비특이적인 결합이 완전히 억제되는 것이 확인되었다(Fig. 4, pannel A). 그러나, 유청 단백질 및 FCS는 PVDF막을 완전히 blocking하지 못하는 것이 확인되어

(Fig. 4, pannels B and C), 그 농도를 높이거나 blocking 시간을 연장할 필요성이 있을 것으로 판단되었다. 그러나, 1% 젤라틴에 의해 계육 복합항체와 돈육 및 ISP와의 교차반응이 완전히 억제되어, 이 후의 실험에서는 젤라틴을 사용하지기로 하였다.

시중에 판매되고 있는 비엔나소시지(돈육 90.14%), 불고기햄(계육 28.89%, 칠면조 31.44%), 그리고 캔터키프랑크소시지(계육 46.52%, 돈육 24.92%)를 구입하여 수용성 단백질을 추출한 후, 100℃에서 30분간 가열하였다. 분획한 내열성 단백질을 이용하여 dot blotting을 실시한 결과, 1µg/well까지 검출되었으며, 계육의 양이 가장 많이 함유되어 있는 캔터키프랑크소시지가 불고기햄보다 강하게 염색되었다(Fig. 5, lanes B and C). 그러나 계육을 함유하지 않은 비엔나소시지는 계육 복합항체와 반응하지 않는 것이 확인되어(Fig. 5, lane A), 본 연구에서 생산한 항체를 이용하면 시중 육제품 중에 함유되어 있는 계육을 충분히 검출할 수 있으리라 사려된다.

계육의 함량을 다르게 하여 제조한 육제품(Table 1)을 이용하여 dot blotting을 실시한 결과, 100% 계육 혼합소시지의 경우, 농도의존적으로 그 반응성이 강하게 나타났으며, 감출한계는 1 µg/well이었다(Fig. 5, lane D). 또한 계육을 함유한 우육 또는 돈육제품의 경우, 계육의 함량에 의존하여 반응하였다(Fig. 5, lane E and F). 그러나 순수계육의 반응강도보다 우육 및 돈육 혼합제품의 강도가 다소 높게 나타났으나 유의적인 차이는 없었으며, 최저 반응량을 비교할 경우 순수계육 제품이 강하게 나타나고 있어 이러한 차이에서 오는 문제점은 크게 우려하지 않아도 될 것으로 사려된다. 따라서 시중에 유통되고 있는 소시지 중 계육이 혼합되어 있을 경우, 본 연구진에 의해 만들어진 항체를 이용하여 충분히 검출할 수 있을 것으로 사려된다. 또한, 본 연구를 위해 제조한 계육 혼합소시지를 이용하여 그 표준 염색농도표를 작성할 경우, 현장에서의 응용도 충분히 가능하리라 생각한다.

Dot blotting은 1회에 분석할 수 있는 시료의 수량이 ELISA의 분석량과 동일하며, 농도가 희박한 시료라 하더라도 농축이 용이하다. 또한 본 연구진에 의해 밝혀진 바와 같이, 정성

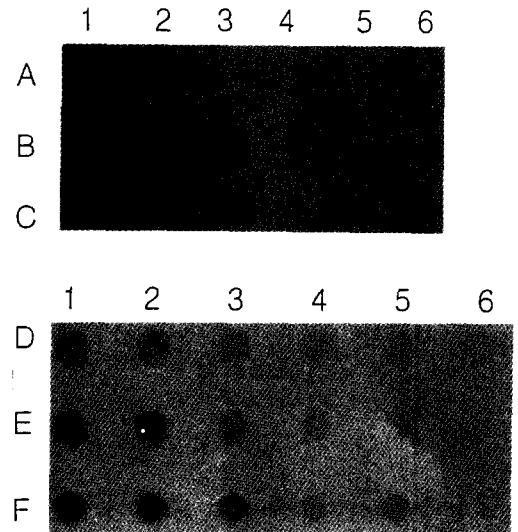


Fig. 5. Dot blotting patterns of various meat products with chicken polyclonal antibody.

Lanes A, viena sausage; B, bulgogi ham; C, frankfruter sausage; D, chicken sausage; E, chicken and pork mixed sausage; F, chicken and Hanwoo mixed sausage. Charged amounts were 20, 10, 1, 0.8, 0.6 and 0.4 µg per well from 1 to 6 for A, B and C, D was charged 50, 30, 20, 10, 5 and 1 µg per well from 1 to 6. Chicken protein amounts of E and F were 100, 50, 30, 10, 5 and 1% from 1 to 6. Antigens were re-heated at 100℃ for 30min.

적인 분석에는 매우 적합한 방법이며, 또한 생산한 계육 복합항체가 매우 특이적이기 때문에 표준농도표에 의한 계육의 함량측정의 가능성도 높으리라 사려된다. 따라서 본 연구진은 계육 특이적인 항체를 이용한 dot blotting의 현장 실용성을 검증하기 위한 연구를 수행하고 있으며, 계육 복합항체의 다양한 이용성도 적극 검토 중에 있다.

요 약

계육, 우육, 돈육, ISP를 100℃에서 30분간 가열한 후, 내열성 단백질을 분획하여 계육 복합항체와 교차반응을 조사한 결과, 계육의 내

열성 단백질과 특이적으로 반응하였으며, 우육, 돈육, 그리고 ISP와는 반응하지 않았다. 계육을 함유한 육혼합물을 이용하여 dot blotting을 실시한 결과, 계육의 검출한도는 $1\mu\text{g}/\text{well}$ 이었으며, 농도 의존적으로 반응하고 있는 것이 확인되었다. Dot blotting을 이용하여 시중 육제품에 함유되어 있는 계육함량을 측정 한 결과, 계육의 양이 가장 많이 함유되어 있는 캔터키프랑크소세지(계육 46.52%, 돈육 24.92%)와 불고기햄(계육 28.89%, 칠면조 31.44%)은 유의적인 차이를 나타내었다. 농도를 달리하여 조제한 계육 혼합 육제품을 이용하여 dot blotting을 실시한 결과, 시중 육제품과 거의 유사하게 농도 의존적으로 반응하는 것이 확인되었다.

감사의 글

본 연구의 일부는 1998년도 농림수산부 첨단 연구과제의 연구비에 의해 연구되었음을 감사드립니다.

참고문헌

1. Kang, K. S., Jung, K. S., Cho, R. I., Sakada and Yoo S. H. : 한우육과 수 입 우육의 판별 검사에 관한 연구. *Korean J. Anim. Sci.*, **32**, 121(1992).
2. Wintero, A. K. and Thomsen, P. D. : A comparison of DNA-hybridization, immunodiffusion, countercurrent immuno electrophoresis and isoelectric fousion for detecting the admixture of pork to beef. *Meat Sci.*, **27**, 75(1990).
3. King, N. L. and Kurth, L. : Analysis of raw beef samples for adulterant meat species by enzyme staining of isoelectric focusing gels. *J. Food Sci.*, **47**, 1608 (1982).
4. Armstrong, S. G. and Leach, D. N. : The use of HPLC protein profiles in fish species identification. *Food Chemistry. Vol. 44*, p. 147(1992).
5. 中江利孝 : 乳肉卵의 科學特性과 組織-食品의 組織. (株)弘學出版. p. 213(1988).
6. Franek, M., Kolar, V., Granatova, M. and Nevorunkova, Z. : Monoclonal ELISA for 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid; Characterization of Antibodies and Assay Optimization. *Agric. Chem.*, **42**, 1369(1994).
7. Chung, H. K., Kim, S. S. and Suh, P. G. : Development and evaluation of two-side binding radioimmunoassay for human α -petoprotein using monoclonal antibodies. *Korean J. Biochem.*, **16**, 97 (1984).
8. Shin, H. K., Park, K. S., Lee, J. W. and Kim, J. B. : Studies on the development of ELISA for monitering porcine myosin. *Korean J. Food Sci. & Tech.*, **25**, 265(1993).
9. Cambpell, A. M. : Monoclonal antibody technology: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. *Amsterdam. Vol. 13*, p. 1(1984).
10. Peskta, J. J. : Enhanced surveillance ad foodborne mycotoxins by immunochemical assay. *L. AOAC. 71*, 1075(1988).
11. Hansen, T. J. : Immunochemical methods for mycotoxin detection in food products. *Trends in Food Sci. Technol.*, **1**, 83(1990).
12. Skerritt, J. H. : Immunoassay of non-meat protein additives in foods. In development and application of immunoassay for food analysis (Rittenburg, J. H. ed). *Elsevier Appl. Sci.*, London & New York, Vol. **81**, p. 125(1990).
13. Harlow, E. and Lane, D. : Antibodies a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Lab.*, p. 421(1988).
14. Hwangbo, S. and Chung, K. Y. : 계육 특이 단백질(50 kDa)의 정제 및 그 항체 생산에 관한 연구. 한국축산식품학회지. **17**, 257(1997).
15. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin-Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951).

16. Markwell, M. A. K., Suzanne M. H., Bieber, L. L. and Tolbert, N. E. : A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.*, **87**, 206(1978).
17. Leammli, U. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680(1970).
18. 平野 久. 1988. Amino acid analysis of western blotted protein from SDS-PAGE. 蛋白質, 核酸, 酵素. **33**, 2388(1988).
19. Hawkes, R. : The dot immunobinding assay. *Methods Enzymol.*, **121**, 484-491 (1986).
20. Hawkes, R., Niday, E. and Gordon, J. : A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal. Biochem.*, **119**, 142-147(1982).
21. Herbrink, P., Van Bussel, F. J. and Warnaar, S. O. : The antigen spot test (AST) : A highly sensitive assay for the detection of antibodies. *J. Immunol. Methods*, **48**, 293-298(1982).

(1998년 7월 30일 접수)