KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 32, No. 6, pp. 1221~1226(2000)

효소면역측정법을 위한 다클론 항대두단백 항체의 생산 및 특성비교

손동화 · 김현정 · 윤숭섭*
한국식품개발연구원, *매일유업주식회사

Property Comparison of Polyclonal Anti-Soy Protein Antibodies Produced for ELISA

Dong-Hwa Shon, Hyun-Jung Kim and Sung-Seob Yun*
*Korea Food Research Institute, *Maeil Dairy Industry Co., Ltd.*

Abstract

Specific antibodies were produced to develope the enzyme-linked immunosorbent assay for analysis of soy proteins and the properties of the antibodies were compared. Isolate soy protein(ISP), and ISP heated with SDS and urea (ISP(SU)), acidic subunits(AS) of 11S globulin were immunized to produce polyclonal antibodies. By using competitive indirect ELISA(ciELISA), the reactivities of the antibodies toward soy proteins treated with different methods were investigated and shown as IC_{50}. IC_{50}'s of anti-ISP antibodies to ISP, ISP(SU), ISP treated with 2-ME(ISP(ME)), and crude 11S were 20, 30, 36, and 1000 μg/mL, respectively. And the values of anti-ISP(SU) antibodies to the same antigens were 100, 5, 4, and 220 μg/mL and those of anti-AS antibodies were 20, 2, 2.5, and 200 μg/mL, respectively. Therefore, anti-AS antibodies showed the highest reactivities toward soy proteins among the produced antibodies as determined by ciELISA.

Key words : Soy protein, 11S acid subunit, antibody, enzyme-linked immunosorbent assay

서 론

대두단백질은 가열 처리로 겔 형성능을 갖게되는데 이러한 성질로 인해 식품에 첨가제로 광범위하게 사용된다[1]. 따라서, 대두단백질이 첨가된 제품의 규격화와 표준화가 필요하고 이를 위해서 분석방법의 개발이 요구되고 있다.

대두단백의 분석을 하여 적용되어 온 분석기법에는 현미경적 방법[2], 전기영동과 펩타이드 분석법[3], 면역학적 방법[4] 등이 있다. 대표적인 면역학적 방법인 효소면역측정법(ELISA)은 항원과 항체의 특이적 반응을 이용함으로써 신속하고 정확한 방법으로 활용될 수 있음이 보고되었다[4].

ELISA에 의한 대두단백의 분석시 주요한 장애요인은 열처리로 인한 시료 단백질의 불용화인데 이를 극복하기 위한 방안으로 시료의 전처리와 지표단백질의 선택 및 처리에 대한 연구가 필요하다. 육제품의 경우 첨가물로 사용되는 분리대두단백은 70%가 11S와 7S subunits으로 구성되어 있어서[5] 지표단백질로 ISP, 11S와 7S subunits을 사용하여 분석법을 개발한 경우가 대부분을 차지하고 시료나 항원의 용해도 증가를 위해 agent를 첨가하여 전 처리하는 경우가 많다[4,6]. Hitchcock 등[4]은 면역원의 준비를 위해 ISP를 뜨거운 urea 용액과 2-mercaptoethanol(2-ME)으로 처리한 다음 중성 완충액으로 희석한 후 항체를 생산하여 ELISA를 실시함으로써 좋은 분석결과를 보였다. 그 후 Ritteburg 등[6]이 이를 개선하여 ISP를 동일조건에서 처리한 후 완충액으로 재생시킨 다음 이를 면역원으로 하여 항체를 생산하였고 ELISA로 분석한 결과 높은 회수율을 보였다. Ravestein 등[7]은 시료를 2-ME와 SDS가 함유된 buffer로 추출하였고 지표단백질로써 열안정성이 높은 11S globulin의 acid subunits을 이용하였다. 이 경우 다른 두류와의 교차반응이 극히 낮았으

Corresponding author : Dong-Hwa Shon, Korea Food Research Institute, 46-1, Backhyun-Dong, Bundang-Gu, Songnam 463-420, Korea
Tel : 82-31-780-9133
Fax : 82-31-709-9876
E-mail : dhs95@kfri.re.kr

며, 0.5% 이상의 대두단백 첨가시 분석이 가능한 것으로 나타났다. 국내의 경우 대두단백의 면역학적 분석법에 대한 연구가 부진한 상태인데, 김 등[8]은 ISP를 SDS로 처리한 후 이를 면역하여 항체를 생산하였고 간접 경합ELISA에 의한 분석법을 보고하였다.

본 연구에서는 다클론 항체를 이용한 최적의 대두단백의 분석법 확립을 위하여 몇 종류의 특이항체를 생산하고 간접 경합 ELISA에 의하여 항체의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

대두분말은 오대산자연식품으로부터 구입하였고 분리대두단백은 두솔산업사로 부터 구입한 supro 500E (Protein Technologists International Co., Checkerboard Square, St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. Trizma® pre-set crystals, phosphate buffered saline with Tween 20, phosphate-citrate buffer tablet, 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine dihydrochloride(TMB), goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate, Freund's complete adjuvant, incomplete adjuvant와 cellulose tubing은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, U.S.A.)로부터 구입하였다. ImmunoPure Plus IgG Purification Kit(#44679)와 EZ-Link™ Plus Activated Peroxidase kit Pierce사(Rockford, IL, U.S.A)로부터 구입하여 사용하였다. 항체 생산을 위한 토끼, New Zealand White rabbit (2.5 kg)은 삼육실험동물(오산, 한국)로부터 구입하였다. Nunc사(Roskilde Denmark)의 microtiter plate from Maxisorp™(#446612)와 THERMOmax™ Molecular Devices사(Sunnyvale, CA U.S.A.)의 microplate reader를 사용하였다. Fast protein liquid chromatography (FPLC)와 사용된 Superose 12 column은 Amersham Pharmacia Biotech(Uppsala, Sweden)제품을 사용하였다.

대두단백의 처리

분리대두단백(ISP) 100 g을 2L의 0.03M Tris buffer (pH 8.0, 0.01 M 2-ME)으로 상온에서 용해시킨 후 4°C에서 25,000 g으로 30분간 원심분리하여 얻은 상징액을 동결건조 하였으며, 이를 ISP(ME)로 명명하였다. 또한 ISP를 SDS와 urea로 처리한 시료인 ISP(SU)는 ISP(ME)를 SDS 0.5%, 2-ME 0.02%, urea 0.5%을 함유한 PBS에 6 μg/mL의 농도로 용해한 후 가열 처리하여 준비하였다.

대두단백의 11S의 acidic subunits을 분리하고자, 대두분말로부터 Iwabuchi 등[9]의 방법을 변형하여 11S globulin을 분리하고 이로부터 전기영동을 이용하여 acid subunits을 정제하였고 Iyengar 등[10]의 방법으로 acidic subunits을 대량정제 하였다. 즉, 시판 대두분말을 soxhlet장치를 이용하여 hexane으로 탈지하고 건조하여 약 72 g의 탈지대두분말을 얻었다. 0.03 M Tris-buffer (pH 8.0), 0.01 M 2-mercaptoethanol(2-ME)으로 상온에서 용해시킨 후 1,000 g에서 20분간 원심분리하였다. 이를 pH 6.4로 낮춘 후 4°C에서 하룻밤 동안 방치하여 11S globulin(glycinin)을 침전시킨 후 KP buffer (2.6 mM KH_2PO_4, 32.5 mM K_2HPO_4, 0.4 M NaCl, 10 mM 2-ME, pH 7.6)에 다시 녹인 다음 황산암모늄을 51%포화도 까지 올려 침전된 것은 제거하고 상징액을 다시 66%의 포화도 까지 올려 침전시켰다. 침전된 단백질을 다시 KP buffer에 녹인 다음 Superose 12 column을 이용하여 정제하였다. 다음으로 11S globulin의 acidic subunits(AS)와 basic subunits(BS)를 분리하기 위하여 Laemmli의 방법[11]으로 12.5%의 SDS-PAGE를 실시한 뒤 AS부위의 단백질 band로부터 단백질을 회수하고 물로 4°C에서 2일간 투석 후 동결·건조하였다.

항체의 생산

대두단백질에 대한 특이항체의 생산을 위하여 위에서 준비한 단백질을 PBS(0.25 M Na_2HPO_4, 0.25 M NaH_2PO_4, 0.75 M NaCl, pH 7.2)에 용해하여 면역하였다. 즉, ISP, ISP(SU), AS의 3종을 각기 2마리씩의 토끼에 일 회분의 면역원 량을 500 μg으로 하여 PBS에 용해시킨 다음 Freund's complete adjuvant와 혼합하여 유단백을 만들어 피하주사 하였다. 추가면역은 2-3주 간격으로 같은 방법으로 실시하였다. 단 이때는 incomplete adjuvant를 사용하였으며, 매 면역 후 1주 후 채혈하고 항혈청을 분리하였다.

항 AS항체-효소 복합체의 제조

Protein A column 및 Sephadex G-25를 이용하여 분리, 정제한 항 AS항체 1 mg(PBS buffer 0.5 mL에 용해)을 CNBr activated HRP 1 mg(증류수 100 μL에 용해)과 혼합 후, 여기에 환원제로서 10 μL의 5 N sodium cyanoborohydride 용액을 즉각 첨가한 다음 1시간 상온에 방치하였다. 이어서 quenching buffer로서 20 μL의 3 M ethanolamine 용액(pH 9.0)을 15분간 처리 후, 탈염하고 냉장 보관하면서 사용하였다.

비경합 간접 ELISA

ISP(ME)는 용해성이 우수하고 다량 확보가 용이하

기 때문에 이를 coating용 항원으로 사용하였다. Microplate에 ISP(ME)를 coating buffer(0.02 M Tris buffer, 0.15 M NaCl, pH 9.0)로 2 μg/mL 되게 희석하여 well에 100 μL씩 넣고 4℃에서 하룻밤 방치하였다. 각 well을 washing buffer(10 mM phosphate buffered saline, pH 7.4, 0.05% Tween 20)로 3회 세척 후 생산된 3가지 종류의 항체는 1/10,000로 washing buffer에 희석한 다음 well에 100 μL씩 넣고 1시간 방치하였다. 세척 후 goat anti-rabbit IgG antibody-HRP를 2차 항체로써 1/10,000로 washing buffer에 희석하여 사용하였다. 1시간 처리 후 세척하고 기질용액(0.01% H_2O_2, TMB 0.1 mg/mL in phosphate citrate buffer)을 30분 반응시킨 후 2 M H_2SO_4로 반응을 정지시키고 microplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 실시하였다.

간접 경합 ELISA(ciELISA)

항원으로써 ISP, ISP(SU), ISP(ME), crude 11S를 분석시 항체와 경합반응 하는데 이용하였다. ISP(ME)로 coating하여 하룻밤 방치하고 3회 세척 후, 적당 배율로 희석한 3종류의 항혈청과 대두단백질인 ISP, ISP(SU), ISP(ME), crude 11S와 각각 1:1 혼합액을 100 μL씩 넣고, 실온에서 1 시간 반응시켰다. 3회 세척한 다음 2차항체 처리부터는 비경합 간접 ELISA와 동일하게 하였다. 한편, 시료의 반응성을 검토하기 위하여 각각 항체의 면역원에 대한 IC_{50}과 다른 시료의 IC_{50}을 각각 구하였다.

직접 경합 ELISA(cdELISA)

경합 반응시 항체대신에 앞에서 준비한 항 AS항체-효소 복합체를 이용하고 경합반응 이후의 2차 항체 처리를 생략하는 점 외에는 위의 ciELISA와 동일하게 하였다.

결과 및 고찰

면역원의 준비 및 항체의 생산

면역원은 3종류의 단백질 ISP, ISP(SU), AS을 사용하였다. 첫 째로 ISP는 가공식품의 부 원료로써 산업적으로 널리 이용되기 때문에 이를 바로 면역하였고 두 번째로, 가열 처리된 시료의 분석에 적용할 수 있도록 2-ME와 urea 등으로 전처리시켜 ISP의 용해도를 향상시킨 ISP(SU)를 면역원으로 사용하였다. 세번째로 사용된 AS는 대두의 주요 단백질이고 열에 안정한 성질을 가지므로 이를 분리한 후 면역원으로 이용하였다. 특히, Fig. 1에서와 같이 lane 2의 대두단백질로부터 pH조절(pH 6.4)과 겔 여과 크로마토그래피를 통하여 11S fraction을 lane 3과 같이 분리하였고 AS의 분자량인 38 kDa 부근의 band만을 잘라내어 buffer에 용출시킨 것으로 면역하였고 이러한 방법으로 11S의 acidic과 basic subunits을 각각의 subunit으로 분리하기 위한 과정이 생략되어 시간이 절약 될 뿐만 아니라 고순도의 면역원을 얻음으로서 특이 항체 생산에 효과적이었다.

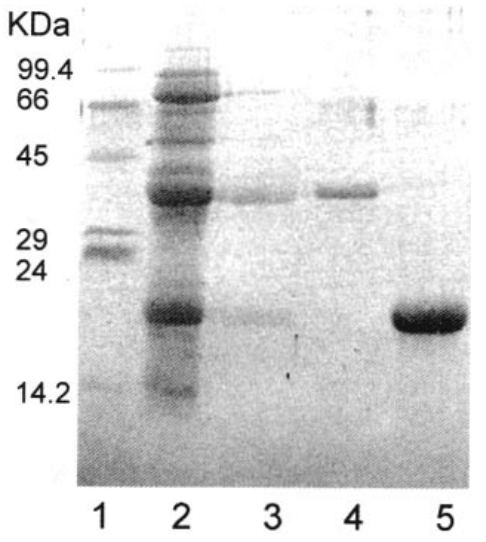

Fig. 1. SDS-PAGE patterns of soy proteins.
Lanes were 1, molecular weight marker; 2, whole soy protein; 3, 11S fraction; 4, 11S acidic subunits; 5, 11S basic subunits.

앞서 준비된 ISP, ISP(SU), AS를 각각 두 마리의 토끼에 수 차례 면역하여 생산한 항혈청을 1/20,000로 희석한 다음, 그 항체가를 비경합 간접 ELISA로 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 여기에서, 항ISP 항체(#2-3)의 항체가가 가장 낮았으며, 항ISP(SU) 항체(#1-2), 항AS 항체(#1-3)의 순으로 높았다. 항체가가 대체로 낮게 나타난 것은 토끼의 사료 중에 대두단백이 포함되어 있어 면역원에 대한 경구관용 현상이 어느 정도 유도되었기 때문으로 생각된다[12]. 한편, 각 면역원에 대한 항혈청 중에서 가장 반응성이 높은 항혈청을 하나씩 선발하여 다음의 ELISA에 사용하였다.

간접 경합 ELISA(ciELISA)

생산된 각각의 항체를 이용하여 처리를 달리한 대두단백질 (ISP, ISP(SU), ISP-ME, crude 11S)에 대한 반응성을 ciELISA로 조사하였다.

먼저, 항ISP 항체의 경우, 처리를 달리한 각각의 단

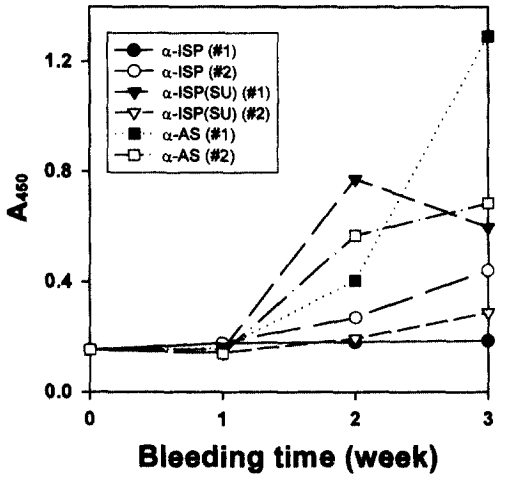

Fig. 2. Production of anti-soy protein antibodies by rabbits.
Rabbits were immunized with ISP, ISP(SU), and AS. ISP(SU) is the ISP heated with SDS and urea and AS is acidic subunits of 11S globulin.

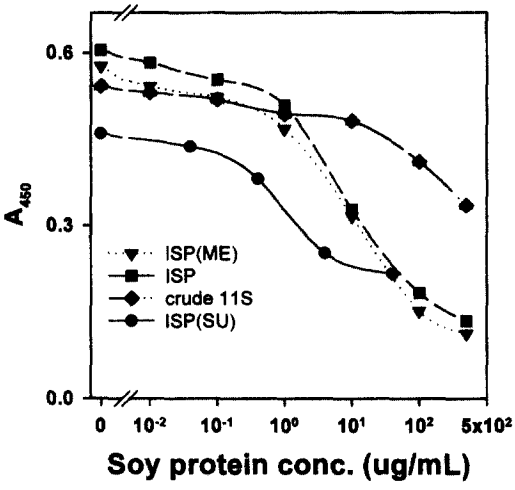

Fig. 3. Reactivity of anti-ISP antibodies toward different soy proteins as determined by ciELISA.
ISP(ME) is a soluble fraction of ISP in Tris-buffer with 2-ME.

백질 중에서 항체와의 반응성이 가장 높게 나타난 단백질은 면역원으로 사용된 ISP이었다(Fig. 3). 각 단백질에 대한 반응성을 IC_{50}으로 나타낸 결과 ISP에 대하여 20 μg/mL이었고 ISP(SU)와 ISP(ME)에 대해서는 30과 36 μg/mL으로 거의 비슷한 반응성을 보였으며 crude 11S에 대하여는 1,000 μg/mL로 낮은 반응성을 보였다.

항ISP(SU) 항체의 경우 이 항체는 ISP와 crude 11S에 대한 IC_{50}이 100과 220 μg/mL로 나타났으나 ISP

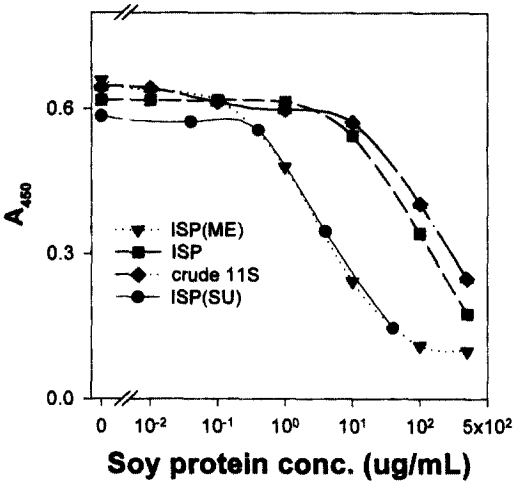

Fig. 4. Reactivity of anti-ISP(SU) antibodies toward different soy proteins as determined by ciELISA.

(SU)와 ISP(ME)에 대하여는 각각 5와 4 μg/mL로 높은 반응성을 나타내었다. 이는 ISP(ME)와 ISP(SU)는 ISP 내에 존재하는 단백질이 각각의 subunits으로 해리되어 있는 항ISP(SU) 항체가 잘 인식할 수 있는 subunit 부분이 ISP나 crude 11S보다 상대적으로 많아짐으로써 반응성이 높아졌기 때문이라고 생각된다.

마지막으로 항AS 항체는 ISP(SU)와 ISP(ME)에 대한 IC_{50}이 2와 2.5 μg/mL으로서 높은 반응성을 보였으며, ISP와 crude 11S에 대한 값은 각각 20과 200 μg/mL으로 나타났다. 결과적으로 항AS 항체는 항ISP 항체나 항ISP(SU) 항체에 비해 대두단백질에 대한 반응성이 가장 우수하였다. 한편, 항AS 항체는 AS와는 잘 결합하나, 11S basic subunits(BS)와는 거의 반응하지 않음을 확인하였다(data 생략).

Rittenberg 등[6]은 대두단백질을 urea용액에서 열처리한 후 재생시켜 면역원으로 사용하였고, 생산된 항체로 ciELISA를 실시한 결과 0.19에서 70 μg/mL사이에서 대두단백질의 정량이 가능하였다고 보고하였다. Rittenberg 등의 결과와 비교해 보면 본 연구에서 개발한 항AS 항체는 대두단백의 종류에 따라 다르지만 검출한계가 1 μg/mL 이상으로 감도가 양호하여 시료분석에 적용할 수 있을 것으로 예상된다.

한편, 모든 그래프(Fig. 1~3)에서 알 수 있듯이 SDS로 처리된 시료에서는 발색치가 전반적으로 떨어졌는데 이는 김 등[8]의 보고와는 약간 상반된 결과이다. 즉, 그들은 0.02%이하의 SDS는 항원 항체 반응에 영향을 미치지 않는다고 보고하였으나, 본 연구에서 0.02%의 SDS를 사용한 결과 전반적인 발색치의 저하

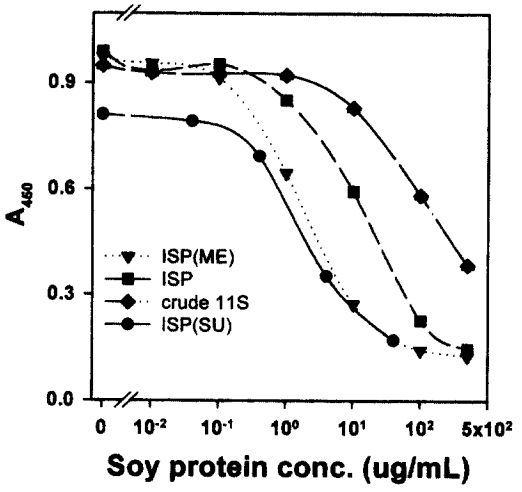

Fig. 5. Reactivity of anti-AS antibodies toward different soy proteins as determined by ciELISA.

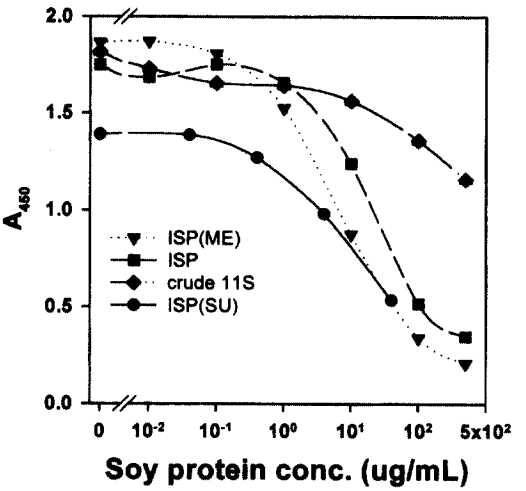

Fig. 6. Reactivity of anti-AS-HRP conjugate antibodies toward different soy proteins as determined by cdELISA.

를 보임으로써 SDS가 항원 항체반응을 방해 하는것으로 생각되었다.

직접 경합 ELISA(cdELISA)

ciELISA는 1차 항체와 항원을 경합시킨 다음 2차 항체를 처리하는 분석법 인데 반하여 cdELISA는 1차 항체에 직접적으로 효소 Horseradish peroxidase(HRP)를 부착시켜 사용하는 방법으로 2차 항체 처리과정을 생략함으로써 분석 시간을 줄일 수 있다. ELISA format에 변화를 주어 검출한계가 더 높은 것을 선택하기 위해 여기서도 cdELISA를 실시하여 ciELISA와 비교하였다. 앞선 실험결과를 토대로 여러 종류의 항체 중에 가장 유용할 것으로 예상되는 항AS 항체를 분리, 정제하고 여기에 실험방법에 명시한 바와 같이 HRP를 부착시켜 anti-AS antibody-HRP conjugate를 준비하였다(data 생략).

cdELISA로 대두단백질과 항AS 항체-효소 결합체와의 반응성은 ciELISA의 경우보다 미약하나 대체로 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 6). 이는 항AS 항체가 HRP와의 conjugation에 의하여 그 반응성에 다소 영향을 받은 것으로 생각된다. 항AS 항체의 각 단백질 ISP, ISP(SU), ISP(ME), crude 11S에 대한 반응성을 IC_{50}으로 나타내면, 각각 27, 13, 8, 2,000 μg/mL이었다. ciELISA 경우와 비교하면 crude 11S에 대한 IC_{50}값이 10배정도 감도가 떨어짐을 확인 할 수 있었다.

특이항체의 반응성 비교

네 가지 종류의 대두단백질에 대한 세 가지 항체의 반응성(IC_{50})을 요약하면 Table 1과 같다. 대부분의 항체가 용해성이 높은 ISP(SU)와 ISP(ME)에 대하여 잘 반응하는 것으로 나타났다. 또한, 항체의 종류에 따라서 다른 항체가 잘 반응하지 못하는 대두단백질과 높은 반응성을 보인 것도 있는데, 항ISP 항체는 ISP(ME)보다 면역원인 ISP에 대한 반응성이 상대적으로 높았다. 따라서, 대두단백질 항원에 대한 항체의 반응성은, 면역시 사용한 대두단백질의 종류에 기인되는 항

Table 1. Summary of IC_{50}'s of anti-soy protein antibodies with different soy proteins as determined by ELISA

Antibody	soy protein, μg/mL				
	ISP[1)]	ISP(SU)[2)]	ISP(ME)[3)]	Crude 11S	ELISA format
Anti-ISP	20	30	36	1,000	ciELISA
Anti-ISP(SU)	100	5	4	220	ciELISA
Anti-AS[4)]	20	2	2.5	200	ciELISA
Anti-AS-HRP	27	13	8	2,000	cdELISA

[1)]ISP is a isolated soy protein.
[2)]ISP(SU) is the ISP which was treated with SDS and urea.
[3)]ISP(ME) is the ISP which was treated with 2-mercaptoethanol.
[4)]Anti-AS was produced against acidic subunit of glycinin.

체의 특이성과 경합 반응시 사용한 단백질 자체의 용해도와 관련성이 높은 것으로 생각된다.

본 연구에서 생산한 항체 중 여러가지 종류의 대두단백질들과 전반적으로 반응성이 우수한 항AS 항체를 이용한 ciELISA는 향후 대두단백질 분석에 관한 연구에 적용이 가능하다고 생각된다.

요 약

대두단백질의 분석을 위한 효소면역측정법을 개발하고자 특이항체를 생산하고 그 항체의 특성을 비교하였다. 분리대두단백(ISP), ISP를 SDS와 urea의 첨가하에 열처리한것(ISP(SU)), 11S 글로불린의 acidic subunit (AS)를 각기 면역하여 다클론 항체를 생산하였다. 간접 경합 효소면역측정법(ciELISA)을 실시하여 처리를 달리한 대두단백질에 대한 이들 항체의 반응성을 조사하였여 IC_{50}으로 나타내었다. 항AS 항체의 경우 IC_{50} 값이 ISP, ISP(SU), ISP를 2-ME로 처리한 ISP(ME), crude 11S에 대하여 각각 20, 2, 2.5, 200 μg/mL로 나타났다. 또한, 항ISP(SU) 항체의 경우 같은 항원에 대해서 100, 5, 4, 220 μg/mL였으며 항ISP 항체의 경우는 각각 20, 30, 36, 1000 μg/mL로 나타났다. 이로서 생산된 3가지 항체 중에서 항AS 항체가 대두단백질에 대한 반응성이 가장 우수하여 ELISA분석법 개발에 적합하였다.

문 헌

1. Nakamura, T., Utsumi, S. and Mori, T. Formation of pseudoglycinins form intermediary subunits of glycinin and their gel properties and network structure. Agric. Biol. Chem. 49: 2733-2740 (1985)
2. Flint, F.O. and Meech, M.V. Quantitative determination of texturised soya protein by a stereological technique. Analyst. 103: 252-258 (1978)
3. Bailey, F.J.A novel approach to the determination of soya proteins in meat products using peptide analysis. J. Sci. Food Agric. 27: 827-830 (1976)
4. Hitchcock, C.H.S., Bailey, F.J., Crimes, A.A., Dean, D.A.G. and Davis, P.J. Determination of soya protein in food using an enzyme-linked immunosorbent assay procedure. J. Sci. Food Agric. 32: 157-165 (1981)
5. Badley, R.A., Atkinson, D., Hauser, H., Oldani, D., Green, J.P. and Stubbs, J.M. The structure, physical and chemical properties of the soybean protein glycinin. Biochim. Biophys. Acta. 412: 214-228 (1975)
6. Rittenberg, J.H., Adams, A., Palmer, J. and Allen, J.C. Improved enzyme-linked immunosorbent assay for determination of soy protein in meat products. J. A.O.A.C. 70(3): 582-587 (1987)
7. Ravestein, P. and Driedonks, R.A. Quantitative immunoassay for soya protein in raw and sterilized meat products. J. Food Technol. 21: 19-32 (1986)
8. Kim, C.J., Kim, J.B., Kim, B.C., Lee, S.B., Jung, S.W., Choe, D.Y. and Ko, W.S.: Development of immunoassay systems for the assay of soy protein in meat products; Antibody production and properties for the assay of soy protein. Korean J. Food Sci. Technol. 24(3): 204-208 (1992)
9. Iwabuchi, S. and Yamauchi, F. Electrophoretic analysis of whey proteins present in soybean globulin fractions. J. Agric. Food Chem. 35: 200-205 (1987)
10. Iyengar, R.B. and Ravestein, P. New aspects of subunit structure of soybean glycinin. Cereal Chem. 58(4): 325-330 (1981)
11. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685 (1970)

(2000년 5월 10일 접수)