

Alpha-hCG 측정을 위한 섬광 근접 측정법 (Scintillation Proximity Assay)에 관한 연구

원자력병원 싸이클로트론 응용연구실¹, 연세대학교 보건과학대학 임상병리학과²
최태현^{1,2}, 임상무¹, 최창운¹, 정위섭¹, 임수정¹, 이수진¹, 이태섭^{1,2}, 오옥두²

Studies on Scintillation Proximity Assay for the measurement of alpha-hCG

Tae Hyun Choi^{1,2}, Chang Woon Choi¹, Sang Moo Lim¹, Kwang Sun Woo¹,
Wee Sup Chung¹, Soo Jeong Lim¹, Su Jin Lee¹, Tae Sup Lee^{1,2}, Ok Doo Awh²

Laboratory of Cyclotron Application¹, Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea,
College of Health Science, Yonsei University², Wonju, Korea

Abstract

Purpose: Scintillation Proximity Assay (SPA) does not require the physical separation of receptor bound form from free form. SPA was applied to the study of interaction of human chorionic gonadotropin (hCG) and anti- α hCG in serum. **Materials and methods:** Anti- α hCG was biotinylated for the binding to streptavidin. The assay was based on the simple competitive binding method between [¹²⁵I]hCG and the hCG in sample serum, with anti- α hCG-coated beads. Aliquots of biotinylated anti- α hCG were dispensed into scintillation vials containing 100 μ l [¹²⁵I]hCG and 200 μ l of either a standard concentration of hCG for preparation of standard curve or unknown sample, and incubated for 20 min. at room temperature. Then 20 μ l streptavidin-coated beads were added to vials, and finally incubated for 10 min at room temperature. Values for unknown samples were then calculated from the standard curve. **Results:** Optimal background counts were certificated using varied radioactivity of radionuclides. Appropriate standard curve was obtained from SPA method successively, and the concentration of hCG from unknown serum was determined by standard curve. The result from SPA assay was similar to that of RIA. **Conclusion:** This observation confirms that SPA method could be useful for clinical diagnosis. (Korean J Nucl Med 2002;36:133-139)

key words : scintillation proximity assay, radioimmunoassay, hCG

서 론

섬광근접측정법의 원리는 에너지를 가지는 전자에 의해 형광작용을 일으키는 polyvinyl-toluene plastic scintillator beads에 항체를 붙이고 수용액상에서 쉽게 에너지를 잃고 소멸되는 낮은 에너지의 전자를 방출하는 방사성 핵종을 beads에 부착된 항체에 선택적으로 결합하는 항원에 표지하여 항원-항체 결합의 정도를 beads에서 발생하는 형광 측정을 통해 관찰할 수 있다¹⁾. 대표적인 방사성 핵종이

Received Dec. 18, 2001; accepted Mar. 27, 2002
Corresponding Author: Sang Moo Lim, M.D.
Laboratory of Cyclotron Application, Korea
Cancer Center Hospital, Seoul 139-706, Korea,
Tel: 02-970-1341
Fax: 02-970-1341
E-mail : cylab2@kcchsun.kcch.re.kr

적용된 면역측정법의 단점으로는, non-isotopic labels과 달리 결합분획과 유리분획의 분리과정이 필요하여 보편적인 system의 구축이 어렵다는 것이다. 섬광근접측정법의 원리를 방사면역측정법의 경쟁반응에 적용하여 방사면역 측정법이 가지는 문제점들을 해결할 수 있으며 민감도가 높고, 분리과정이 필요 없는 특징을 가지고 있다^{2,3)}. 방사성 핵종이 표지된 항원과 beads상에 부착된 항체간의 결합이 이루어지면, 항원에 표지된 방사성 핵종이 방출하는 낮은 에너지의 전자가 beads에 도달하여 에너지를 전달하고, 에너지를 받은 beads는 형광을 방출하게 된다. 방출된 형광은 액체섬광계수기로 항체-항원의 결합 양에 따른 비례를 보이며 증가되는 것을 측정할 수 있다. 이것은 삼중수소와 같은 베타선 방출 핵종을 사용시 측정에 사용되는 섬광액의 폐기 문제를 해결할 수 있고 이러한 섬광근접측정법의 원리를 응용하여 면역학, 수송체 연구에 새로운 방법으로 활용될 수 있다. 현재 면역 측정법의 방법이 방사성동위원소 이용에서 non-isotopic methods로 바뀌고 있다. 그것은 피폭에 대한 막연한 두려움이 가장 주된 이유이다. 그러나, 널리 사용되는 ¹²⁵I의 경우 실제 사용되는 양이 매우 적은 방사능을 사용하고, 피폭이 우려되는 방사성 핵종에 비해 짧은 반감기(~60일)를 가진다. 섬광근접측정법의 signal이 증가하는 원리는 antigen의 방사성 핵종의 에너지와 beads의 항원-항체반응에 의한 bridging에 의한 응집이 중요한 역할을 한다. 섬광근접측정법의 중요한 속성은 single reaction mixture를 통해 시간경과에 따른 항원-항체 포화반응을 관찰할 수 있다는 것이다^{4,6)}. 이것은 방사면역측정법 개발 시에 유용한 장점으로 사용될 수 있다. 혈청에서 측정 가능한 hCG(Human Chorionic Gonadotropin) 홀몬은 정상적으로는 황체퇴화를 방지하여 임신이 유지되게 하는 홀몬으로 수정후 6일부터 모체의 혈액에서 검출되며, 14일후에는 요에서도 검출된다. 이 후 급격히 증가하여 임신 60-70일 정도에서 최고치에 달했다가 임신 100-130일까지 급격히 감소되어 그 후는 감소된 상태로 임신기간동안 계속 약간씩 분비된다. hCG 홀몬은 α , β 2개의 sub-unit로 이루어진 glycoprotein이고 임신 초기의 trophoblastic cells에서 만들어질 뿐 아니라, 남자와 비임신 여성의 gonadal

과 non-gonadal origin의 malignant cell 에서도 합성되어진다. 이것을 이용하여 종양발생시 종양에서 hCG홀몬이 과도하게 발현되는 것을 T-cell이 인식하게 만드는 방법을 연구하기도 한다. 또한 hCG를 non-gonadal neoplasms의 tumor marker로서 follow-up에 이용하고 있다.

본 연구는 섬광 근접 측정법을 사용하여 혈청 내 hCG 측정이 실제 적용될 수 있는지 표준곡선을 작성하고, 임상 검체를 측정하여 방사면역측정법과 섬광 근접 측정법을 비교하고자 한다.

대상 및 방법

1. 항체의 biotinylation

항체에 biotin을 합성하기 위하여 50mM sodium bicarbonate buffer pH 8.1를 사용하여 Goat anti- α hCG IgG(100 μ g/ml)를 준비하였다. 10mg/ml의 농도로 sulfo-NHS-LC-biotin(Pierce Co, USA)을 증류수에 녹인 뒤 20 μ l를 마이크로파이펫을 사용하여 anti- α hCG(100 μ g) 1ml에 넣은 뒤, 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응하지 못한 biotin을 제거하기 위하여, Centricon-30을 사용하여 5,000 \times g에서 30분 동안 원심분리를 3회 반복하며 10mM phosphate buffered saline pH (PBS)으로 교체하였고, 항체는 100 μ g/ml의 농도로 맞추어 10mM PBS에 보관하여 사용하였다.

2. ³H, ¹²⁵I의 방사능 차이에 따른 자연계수치 측정

³H, ¹²⁵I등의 방사성 동위원소 방사능에 따라 SPA bead의 자연계수치가 어떻게 변하며, 실제 계측시 계측값에 어떤 영향을 미치는지 확인하기 위하여 tritium(³H)을 약 1×10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 Bq별로 희석하였고 Na¹²⁵I을 7×10^5 , 7×10^4 , 7×10^3 , 7×10^2 , 70 Bq별로 희석하여 각각의 핵종 방사능 변화에 따라 계측 채널의 영역을 삼중수소를 측정하는 채널로 조정하여 액체섬광계수기(Packard Co, USA)를 사용하여 측정하였다. 각각의 핵종의 방사능이 달라짐에 따라 계측값이 어떻게 변하는지 실험하였다.

3. hCG 표준농도 측정

hCG RIA kit(Incstar Co, USA)의 표준물질과 추적자(¹²⁵IhCG)를 사용하여, 표준곡선을 작성하고자 하였다. 먼저 anti-α hCG-biotin을 1μg/ml로 희석하였다. 표준물질의 농도는 0, 5, 10, 25, 50, 100, 200 mIU/ml 순으로 사용하였다. 측정방법은 다음과 같이 수행하였다.

폴리에틸렌 시험관에 표준물질을 200μl를 넣은 뒤, [¹²⁵I]hCG(tracer)를 100μl 첨가한다. anti-α hCG- biotin(1μg/ml) 100μl 추가하여 넣고, 잘 교반한 후, 실온에서 20분동안 방치한다. streptavidin이 코팅된 SPA bead를 20μl 첨가한 후, 고루 반응할 수 있도록 잘 섞은 뒤, 실온에서 10분 방치한다음, 액체섬광계수기의 측정채널을 삼중수소로 맞춘 뒤, 계측한다.

임상검체중 RIA로 측정한 것 중에서 hCG titer가 높게 나타난 혈청을 10배로 연속 희석하여 SPA법으로 측정할 시 희석배수에 따른 상관관계를 보고자 하였다.

4. 임상 검체 측정

본 병원 핵의학과에서 RIA kit를 사용하여 측정환자의 혈청 중에서 hCG 농도가 높은 것과 낮은 것을 섞어서 다섯 개의 검체를 가지고 SPA법으로 측정한 후, RIA 측정값과 비교하여 보았다.

결 과

1. ³H, ¹²⁵I의 방사능 차이에 따른 자연계수치 측정

SPA 방법은 비정기 짧은 방사성 동위원소를 함유한 항체 반응에 의해 SPA bead와 비정 내 접근한 방사성 동위원소의 방사선이 도달하게 되어 SPA bead로부터 방출된 광자를 측정하는 것이다. 그러므로 항원 항체 반응에 의해 접근되는 표지항원에서의 방사성 동위원소 외의 자유로이 분포되는 방사성 동위원소의 배후 방사능에 의한 측정값의 영향에 대한 평가가 필요하다.

³H은 방사능을 10~10⁵ Bq별로 희석한 것을 섬광액을 넣고 측정한 것과 SPA bead만을 넣고 측정한 것 두 가지를 측정하여 실제 방사능 수치와 SPA법 사용시의 자연계수치를 각각 액체섬광계수기를 사용하여 측정하였고, ¹²⁵I은 70~7×10⁵ Bq별로 희석하여 감마계측기로 측정한 실측치와 SPA bead만을 넣고 액체섬광계수기를 사용하여 자연계수치를 각각 측정한 결과 RIA와 SPA에서 한 검체당 사용되는 [¹²⁵I]hCG (2000 Bq)의 방사능에서는 배후 방사능에 의한 영향 정도가 액체섬광 계수기로 측정환 자연 계수에 큰 영향이 없음을 확인하였다(Table 1).

Table 1. Background Counts of Varying The Radioactivity of Radionuclide.

³ H			¹²⁵ I		
activity(Bq)*	real count(cpm)□	SPA(cpm)■	activity(Bq)*	real count(cpm)#	SPA(cpm)■
10	281	38	70	358	92
1 × 10 ²	2522	21	7 × 10 ²	3319	70
1 × 10 ³	23798	31	7 × 10 ³	32888	134
1 × 10 ⁴	224185	86	7 × 10 ⁴	322374	1075
1 × 10 ⁵	2130422	635	7 × 10 ⁵	3123521	9792

* Radioactivity of tritium in the standard vial

□ Radioactivity was measured with liquid scintillation counter using scinti-cocktail

■ Photon was counted with liquid scintillation counter using SPA beads

Radioactivity was measured with gamma-counter

2. hCG 표준농도 측정

SPA법은 제한된 체적속에서 항원 항체 반응을 이용하였기 때문에 기하학적인 요소가 영향을 미칠 수 있다. 알고 있는 농도의 표준 시료를 이용한 경우는 항원 항체 반응을 최적화 시킬 수 있지만, 환자 혈청의 경우 높은 농도의 hCG가 존재하면 희석이 필수적이며 이로 인한 영향을 확인할 필요가 있다.

SPA법을 사용하여 hCG standard 물질을 측정한 결과 Fig 2와 같이 미지 검체의 hCG 농도 결정을 위한 표준 응답곡선을 작성할 수 있었다. 높은 hCG 농도가 확인된 환자 혈청을 10배로 연속 희석하여 희석 단계별로 각각 SPA법으로 측정된 값이 일정한 경향을 나타내며 달라지는 것을 확인하여, 희석에 따른 hCG 농도 측정이 가능함을 확인하였다(Fig 3).

Table 2. Comparison of RIA and SPA in Determination of hCG Concentration

Specimen	hCG (mIU/ml)	
	RIA	SPA
1	446	502
2	736	534
3	79309	9640
4	753020	423500
5	3	125

Used specimen were patient's sera.
 RIA was performed by commercial kit using ¹²⁵I-hCG antigen and counted with gamma counter.
 SPA was evaluated with standard curve made by anti- a hCG antibody coated SPA beads.

3. 임상 검체 측정

위에서 확립된 표준 응답 곡선의 표준농도를 측정하는 방법에 따라, 임상 검체의 hCG 농도를 측정하였다. 5 명의 환자 혈청을 검사실에서 사용하는 상용키트로 시행하였다. RIA법인 상용키트와 SPA법을 사용한 검체의 hCG 농도 결과치가 완전히 일치하지는 않았으나, 유사한 결과를 나타내었다 (Table 2).

고찰

조작의 간편성과 시간경과에 따라 역학적 변화를 관찰하기에 편리한 SPA법의 활용 가능성과 특성을 확인하기 위한 실험을 수행하였다. Scintillation proximity assay(SPA)는 독특한 RIA의 검사법으로 polymer bead와 그 bead에 공유결합으로 연결된 항원이나 항체가 주된 구성이다(Fig 1). polymer bead는 fluorophor라는, 액체섬광계수기 사용되는 액체 섬광액인 POP, POPOP등으로 구성되어 있어, 에너지를 가지는 전자에 의해 여기되어 형광 신호를 내게 된다. 입자 방사선을 방출하는 방사성 동위원소가 표지된 항원이 항체가 부착되어 있는 polymer bead의 비정거리에 들어오고 섬광체를 여기시켜 광자를 방출하게 된다²⁾. 사용되는 핵종으로는 입자를 방출하는 알맞은 비정을 갖는 방사성핵종들로 ³H, ¹²⁵I이 있다. ³H은 6 keV의 베타입자를 방출하고 그 비정은 4 μm이다. ¹²⁵I은 35 keV의 auger전자를 방출하고 비정은 35 μm이다. 이 두 방사성동위원소가 SPA에 적당한 핵종으로 널리 사용되고 있다³⁾. 그 외에 ¹⁴C, ³⁵S등은 입자를 방출하는 핵종이나 물속에서 비정이 80~90 μm로 SPA법에 사용하기에는 자연계수치가 지나치게 높아 부적당하다¹⁾. SPA법은 순수 베타레이 방출 핵종을 섬광액 첨가없이 측정이 가능하며, 종양항원이나 세포막 수용체연구에 유용할 것이다.

면역측정법의 필수적인 항체에 대해 biotin을 항체의 아미노기와 biotin의 카르복실기가 펩타이드 결합을 이루게 만들어, biotin이 합성된 항체를 효과적으로 제조하였다. 측정방법으로서의 유효성을 확인하기 위하여 표준곡선을 작성하여 실제 적용이 가능함을 확인하였다. RIA법에서 사용되는 표지항원의 방사능은 대개 한 검체당 2000~3000Bq을 사용하며, 이것은 비슷한 방사능을 사용하는 SPA법에서 spa bead에 근접한 표지항원 이외의 측정용액상의 표지항원이 자연계수치로 영향을 미칠 것인지에 대해 ³H, ¹²⁵I에서 자연계수치 측정값과 비교하여 볼 때 별 다른 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 물론 반응 용액의 양이 많고 적음에 따라, 어느 정도

계측값이 변동되는 경향을 보이기는 하지만, 더 적거나 많아도 표준곡선을 적용하는데에는 문제가 없었다.

위의 결과에서 전체적인 counts가 낮게 나타나는 것은 beads간의 bridging이 적게 이루어진 것과 표지항원과 biotin-항체의 항원-항체 결합능이 떨어지기 때문으로 생각된다. 이러한 단점을 극복하기 위해서는 다클론 항체를 사용하거나, 단 클론 항체사용시에 이차 항체를 사용하여 항원-항체 결합의 정도가 bridging과 비례하여 일어나게 하는 것이 필요하다.

또한, 표지항원의 방사성 동위원소 표지양도 중요하다. gamma-counter의 측정에 최적화된 kit를 모체로 이용하여 spa법을 적용하였기 때문에 beads에서 발생하는 형광의 측정에 완전하게 반영될 수는 없었을 것이다.

임상 검체를 RIA법으로 측정된 값과 SPA법으로 측정된 값간의 차이가 나타나는 것을 볼 수 있었는데, 그 이유는 hCG 구조가 α , β subunit로 나누어져 있고, 이 중 α subunit의 아미노산 배열이 leuteinizing hormone(LH), follicle stimulating

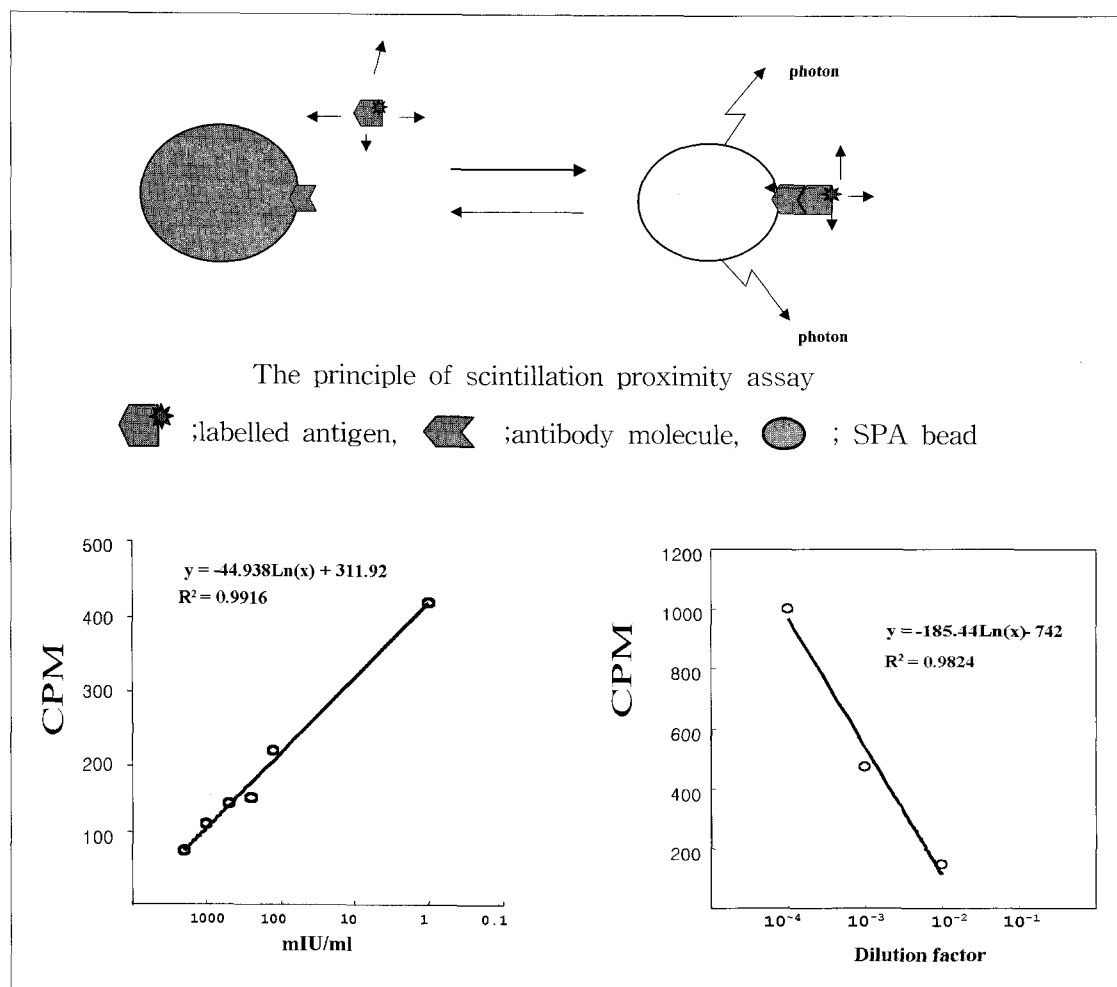


Fig. 1. Standard curve of hCG standard assay. ¹²⁵I-hCG anti- α hCG antibody and various amounts of unlabeled hCG were incubated in SPA buffer mixture for 10 minutes at room temperature.

Fig. 2. Sera of patients having high hCG concentration were used for dilution effect of SPA system.

hormone (FSH), thyroid stimulating hormone (TSH)의 α subunit와 구조적으로 유사하여 본 실험에서 사용한 anti- α hCG 항체 사용이 hCG 이외의 다른 요인들에 의해 영향을 받아 측정값의 차이가 난 것으로 생각된다.

요 약

목적: 섬광 근접측정법은 항원 항체 반응 후 결합 분획과 유리분획을 분리하는 과정이 필요없다. 이러한 원리를 검체 내 hCG와 항 α hCG 항체간의 항원 항체 반응에 적용하고자 한다. **대상 및 방법:** 항 α hCG 항체를 biotin과 결합시켜 SPA bead에 부착된 streptavidin과 부착 가능하게 만들었다. 이 측정법은 항 α hCG 항체가 부착된 SPA beads에 대해 혈청내 hCG와 표지항원인 [125 I]hCG간의 경쟁 반응을 기본 원리로 이용하였다. Biotin 표지 항 α hCG 항체를 [125 I]hCG 100 μ l와 표준용액이나 환자 혈청 200 μ l이 들어있는 실온에서 20 분 방치하였다. 그리고 streptavidin이 붙은 SPA beads 20 μ l를 바이알에 넣고 10분 더 방치한다. 환자 혈청의 수치를 표준 응답곡선을 통해 계산하였다. **결과:** SPA 측정법에 사용되는 방사성 핵종의 방사능 양에 따라 반응 용액 속에서 SPA bead와 자유 방사성 핵종에 의한 배후 방사능이 측정값에 영향이 없음을 확인하였다. SPA 방법을 응용한 측정에서 적합한 표준 응답곡선을 얻었고, 실제 환자혈청에서의 hCG 농도를 결정할 수 있었다. **결론:** 이 실험을 통해 SPA 방법을 이용한 측정법이 임상진단에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Udenfriend S, Gerber L, Nelson N. Scintillation Proximity Assay: A Sensitive and Continuous Isotopic Method for Monitoring Ligand/Receptor and Antigen/Antibody Interactions. *Analytical biochemistry* 1987;161:494-500.
2. Hart H, Greenwald E. Scintillation-Proximity

- Assay of Antigen-Antibody Binding Kinetics: Concise Communication. *J Nucl Med* 1979;20: 1062-5.
3. Bosworth N, Towers O. Scintillation proximity assay. *Nature* 1989;341:167-8.
4. Nelson N. A Novel Method for the Detection of Receptors and Membrane Proteins by Scintillation Proximity Radioassay. *Analytical biochemistry* 1987;165:287-93.
5. Sonatore L, Wisniewski D, Frank L, Cameron P. The Utility of FK506-Binding Protein as a Fusion Partner in Scintillation Proximity Assays: Application to SH2 Domains. *Analytical biochemistry* 1996;240:289-97.
6. Baker C, Poorman R, Kezdy F, Staples D, Smith C, Elhammer A. A Scintillation Proximity Assay for UDP-GalNAc:Polypeptide, N-Acetylgalactosaminyltransferase. *Analytical biochemistry* 1996; 239:20-4.
7. Udenfriend S, Gerber L, Brink L, Spector S. Scintillation proximity radioimmunoassay utilizing 125 I-labeled ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:8672-6.
8. Carrick T, Bingham B, Eppler C, Baumbach W, Zysk J. A Rapid and Sensitive Binding Assay for Growth Hormone Releasing Factor. *Endocrinology* 1995;136:4701-4.
9. Srivastava P, Russo J, Russo I. Chorionic gonadotropin inhibits rat mammary carcinogenesis through activation of programmed cell death. *Carcinogenesis* 1997;18:1799-808.
10. Housseau F, Rouas N, Benifla J, Marcillac I, Roy M, Troalen F, et al. Reaction of peripheral-blood lymphocytes to the human chorionic gonadotropin α sub-unit in patients with productive tumors. *Int. J. Cancer* 1995;63: 633-8.
11. Hoon D, Sarantou T, Doi F, Chi D, Kuo C, Conrad A, et al. Detection of metastatic breast

- cancer by β -hCG polymerase chain reaction. *Int. J. Cancer* 1996;69:369-4.
12. Lerner C, Saiki A. Scintillation Proximity Assay for human DNA topoisomerase I using recombinant biotinyl-fusion protein produced in baculovirus-forinfected insect cells. *Analytical biochemistry* 1996;240:185-96.
13. Danhay H, Broadley K, McCableP, Nials A, Sanjar S. A simple, rapid, and sensitive scintillation proximity assay for the determination of levels of guinea-pig interleukin-5 in bronchoalveolar lavage samples. *J Pharmaco Toxicol Meth* 1997;37:161-6.
-