



IgY 항체를 이용하여 Lactoperoxidase 정량을 측정하기 위한 Indirect ELISA 방법의 개발

이승배* · 최석호 · 최재원

상지대학교 생명공학과

Indirect ELISA Method for Measurement of Lactoperoxidase using IgY Antibody

Seung-Bae Lee*, Suk-Ho Choi and Jae-Won Choi

Department of Biotechnology, Sangji University

Abstract

To determine the concentration of lactoperoxidase (LPO), an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed. Anti-LPO egg yolk immunoglobulin (IgY) was transferred to egg yolk by immunizing of Brown hens with LPO. The titer of purified anti-LPO IgY was 1: 520,000. The immunological response of anti-LPO IgY with α -lactalbumin, β -lactoglobulin, casein and lysozyme were evaluated, resulting that the anti-LPO IgY found to be a specific antibody toward LPO and no cross-reaction was observed against α -lactalbumin, β -lactoglobulin, casein, and lysozyme in double immunodiffusion test and ELISA test. In indirect ELISA method, coating concentration of LPO and dilution rate of anti-LPO IgY was 0.25ug/mL and 1:8,000 respectively. Sensitivity in the standard curve of LPO was ranged from 0.01 to 1ug/mL using anti-LPO IgY.

Key words : lactoperoxidase, anti-lactoperoxidase IgY, indirect ELISA

서 론

Peroxidase는 일반적으로 식물, 타액 및 눈물 등에 분포되어 있는 효소로 우유의 peroxidase는 주로 유산균의 증식을 억제하는 기능이 있기 때문에 식물성 peroxidase와 구분되어 lactoperoxidase(LPO)로 명명되고 있다(Kim et al., 1996).

LPO는 우유 중 농도가 약 30 mg/L로 많은 양이 함유된 효소로서 분자량이 77,500 dalton인 glycoprotein으로 당 부분에는 sialic acid가 없이 hexosamine만으로 구성되며, 효소의 활성은 비유 후 4일째 최고의 활성을 나타낸 후 감소하기 시작하고, 가열시 80°C에서 3초 만에 불활성 된다(Jenness, 1982).

원유내에 있는 60종류 이상의 효소(Farkey and Imafidon, 1995) 중 LPO와 alkaline phosphatase는 열에 민감하여 우유의

살균에 대한 지시효소로 이용되어왔다(Griffiths, 1986 ; Pellegrino et al., 1995).

Lactoperoxidase system(LPS)은 LPO, thiocyanate(SCN) 및 파산화수소로 구성되어 있으며 원유내에서 천연적으로 항균 활성을 나타내며(Reiter, 1985), 사람과 동물의 타액에서도 LPS가 있다고 보고된 바 있다(Tenovuo, 1985).

LPS는 *Escherichia coli*을 포함한 그람음성세균에 대해서도 항균 활성을 가지며(Bjorck et al., 1975) *Staphylococcus aureus*와 같은 그람양성 세균의 증식을 억제할 수 있다 (Kamau et al., 1990).

지금까지는 화학 보존제로서 벤조산염, 소르빈산염, 아질산염 및 황산염 등이 식품보존용으로 널리 사용되고 있지만 그들의 안전성에 대해 문제가 제기되어 왔다.(Frazier, 1988; Knekt et al., 1999). 최근에는 여러 가지 식품에 GRAS (generally recognized as safe)로서 사용될 수 있는 천연보존제로서 LPS가 매우 적합한 것으로 De wit와 ven Hooydonk(1996)가 보고하고 있고, 치즈(Earnshaw et al., 1989), 요구르트(Na-

* Corresponding author : Seung-Bae Lee, Department of Biotechnology, Sangji University, Wonju 220-702, Korea. Tel: 82-33-730-0542, Fax: 82-33-730-0503, E-mail: sblee@sangji.ac.kr

kada et al., 1996), 계육(Wolfson et al., 1994), 육(Kennedy et al., 2000) 등 식품에 항균효과를 부여하기 위해 LPO를 첨가하는 연구가 많이 수행되고 있으므로, 식품에 첨가된 LPO의 양을 측정하는 것은 매우 중요하다고 생각된다. Shin 등(2001)은 재조합 인간 LPO를 토끼에 주사하여 생산한 폴리크로날 항체를 이용하여 ELISA를 개발한 바 있으나 계란에서 분리한 IgY 항체를 이용하여 LPO 농도를 측정하는 ELISA 방법은 아직 연구된 바 없다.

난황 항체는 이미 포유류의 혈청에서 얻은 항체에 비해 생산비가 저렴하게 많은 항체를 생산할 수 있고, 포유동물과 계통 발생의 차이로 생화학적 잇점을 가지며, 피를 채혈하지 않아 등 많은 장점이 있다고 보고되었다(Larsson et al., 1993). 그러나 아직까지 면역분석을 하는 데 덜 사용되고 있으나 Glassmann 등(1990)에 의하면 포유동물의 단백질은 포유동물에서보다 가금류에서 더 큰 면역원성을 보이며 특히, 난황 항체의 큰 장점은 rheumatoid factor에 결합하지 않으므로 류마티스증이 있는 환자나 동물의 혈액에서 면역분석을 할 때 false-positive 반응이 일어나는 것을 방지할 수가 있으며 또한 background의 증가를 감소시킬 수 있다고 보고하고 있다.

본 연구는 LPO 량을 측정하기 위해 산란계를 이용하여 LPO에 대한 IgY 항체를 생산 분리 정제한 후 항체의 면역학적 특성을 검토하였으며 이를 이용하여, enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법을 개발한 연구이다.

재료 및 방법

공시재료

LPO, casein, α -lactalbumin, β -lactoglobulin, lysozyme 및 Complete Freund's adjuvant는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)에서 구입하였으며, 기타 시약은 별도로 명시된 것 이외에는 특급시약을 사용하였다.

IgY 항체 생산

25주령된 Hy-line Brown 산란계를 사용하여 LPO 500 μ g를 생리적 식염수에 녹인 후 Complete Freund's adjuvant와 섞어 만든 immunogen을 닭의 가슴근육에 주사한 후 Incomplete Freund's adjuvant를 사용하여 5번의 booster 주사를 Fig. 1에 나타낸 간격으로 실시하고, 계란은 면역시키는 동안 매일 수집하여 4°C 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

난황에서 IgY 항체 분리 방법

계란으로부터의 anti-LPO IgY 항체는 Akita와 Nakai(1992) 방법에 따라서 일단 lipoprotein을 침전시킨 다음 수용성 분획으로부터 분리하였다.

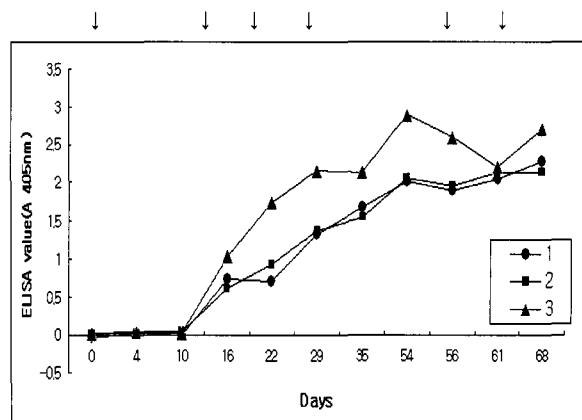


Fig. 1. Change of antibody level in hen egg yolk during the immunization period. Level of lactoperoxidase antibody in egg yolk is expressed as ELISA value (405 nm) at 1:1,000 dilution using the lactoperoxidase as antigen. The arrows indicate 0, 14, 21, 28, 56 and 63 days when chickens were injected with lactoperoxidase. Data are an average of duplicate measurements. 1-3 : Subject chickens.

ELISA 방법

난황에 들어있는 특이 항체의 역기는 Lee 등(2000)이 사용한 ELISA 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 50 mM carbonate buffer(pH 9.6)로 LPO 또는 단백질을 1 μ g/mL로 회석한 후 96 well polystyrene plate에 100 μ L씩 분주하고, 4°C에서 하룻밤 방치하여 coating시킨다. PBST(phosphate buffered saline, 0.05% Tween 20, pH 7.4)로 4번 washing시킨 후 2% bovine serum albumin(BSA)가 포함된 0.01 M PBS(pH 7.4)을 200 μ L 넣고 37°C에서 2시간 blocking한 후 PBST로 4번 washing 시킨다.

회석한 anti-LPO IgY 항체를 100 μ L 넣고 37°C에서 1시간 반응한 다음 PBST로 4번 washing시킨다. Rabbit anti-chicken IgG-alkaline phosphatase(Sigma, USA)를 PBST에 1:1000으로 회석한 것을 100 μ L 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨다. 그 후 PBST로 5번 washing한 후 alkaline phosphatase(AP)의 기질인 p-nitrophenyl phosphate을 100 μ L 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 3 N NaOH 50 μ L을 넣고 반응을 종료시킨 다음 ELISA reader(BIO-RAD, Model 550, USA)을 이용하여 405 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하여 ELISA value로 나타내었다.

Indirect ELISA 방법

LPO를 정량하기 위해 사용한 indirect ELISA 방법은 Clarke 등(1994) 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 50 mM carbonate buffer(pH 9.6)로 LPO를 농도별로 96 well poly-

styrene plate에 100 μL 씩 넣고 4°C에서 하룻밤 방치하여 coating시켰다. PBST로 4번 washing시킨 후 2% BSA가 포함된 10 mM PBS(pH 7.4)을 200 μL 넣고 37°C에서 2시간 blocking 한 후 PBST로 4번 washing시킨다.

희석한 anti-LPO IgY 항체를 50 μL 와 LPO 혼탁액 50 μL 또는 시료 50 μL 넣고 37°C에서 1시간 반응한 다음 PBST로 4번 washing 시킨다. Rabbit anti-chicken IgG-AP(Sigma, USA)를 PBST에 1:1000으로 희석한 것을 100 μL 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨다. 그 후 PBST로 5번 washing한 후 AP의 기질인 p-nitrophenyl phosphate을 100 μL 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 3N NaOH 50 μL 을 넣고 반응을 종료시킨 다음 ELISA reader(BIO-RAD, Model 550, USA)을 이용하여 405 nm에서 각 well의 흡광도를 측정하여 ELISA value로 나타내었다.

Immunodiffusion 방법

Double immunodiffusion은 Ouchterlony와 Nilsson(1978)의 방법을 약간 변형하여 PBS에 1% agar(Difco, USA)와 2% polyethylene glycol(PEG: sigma, USA) 600을 첨가하여 두께 1 mm 정도의 gel을 형성시킨 다음 Punch(BIO-RAD, USA)을 사용하여 직경 1.5~3 mm의 구멍을 뚫고, 중심원에 anti-LPO IgY 항체 또는 LPO를 넣고 주변원에 LPO, casein, α -lactalbumin, β -lactoglobulin 및 lysozyme 또는 anti-LPO IgY 항체를 채운 후 37°C에서 하룻밤 동안 유지시킨 후 0.5% Coomassie brilliant blue R-250(BIO-RAD, USA) 용액으로 염색하였다.

결과 및 고찰

LPO로 면역된 3마리의 산란계(Hy-line Brown)에서 얻은 계란의 IgY 항체 역가를 ELISA로 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 3마리 모두 12일부터 항체가 형성되기 시작하여 산란계 1은 56일째 최고의 항체역가를 보였으나 산란계 2와 3은 거의 70일째가 되어서 높은 항체의 역가를 보여 주었다. Lee 등(1999)이 lactoferrin을 산란계에 면역시킨 후 나타난 결과는 37일째 최고의 역가를 보인 것과 본 실험의 결과를 비교해 보면 20일에서 30일 정도 늦게 최고 수준의 항체 역가에 도달하는 것으로 차이를 보여 준다. 이런 결과는 산란계의 개체차와 immunization protocol에 따라 차이가 나는 것으로 생각된다. 계란으로부터 lipoprotein을 침전시킨 수용액 분획으로부터 분리한 anti-LPO IgY 항체 titer을 ELISA로 측정한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. anti-LPO IgY의 titer는 흡광도 405 nm에서 1:512,000으로서 비교적 높은 역가를 나타냈으며 이런 결과는 Lee 등(1999)이 산란계에서 생산한 anti-

lactoferrin IgY titer와 거의 일치한다.

산란계에서 생산한 anti-LPO IgY 항체가 항원인 LPO와 면역반응을 조사하기 위해 실시한 결과(Fig. 3, 4) LPO 항원을 중심 well에 넣고 anti-LPO IgY 항체를 주변 well에 2배 희석법으로 희석하여 double immunodiffusion을 실시한 결과(Fig. 3)를 보면 1:4까지 명확하게 침강선을 보여주었고, anti-

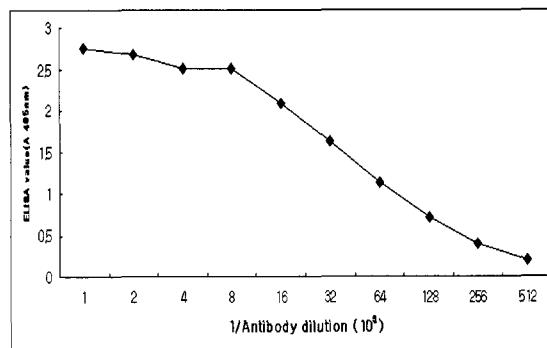


Fig. 2. Titration curve of anti-lactoperoxidase IgY by ELISA. The anti-lactoperoxidase IgY activity is expressed as ELISA value (405nm). Data are an average of duplicate measurements.

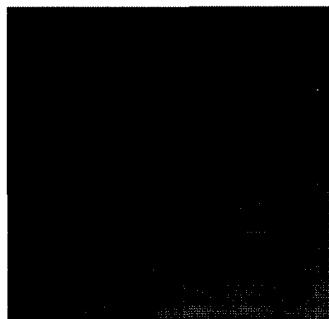


Fig. 3. Double immunodiffusion pattern of anti-lactoperoxidase IgY against lactoperoxidase. Ag : lactoperoxidase (1 mg/ml). 1~6 : anti-lactoperoxidase IgY (double dilution from 1:1).

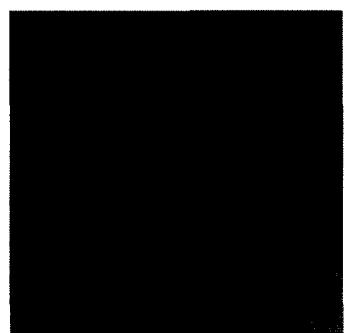


Fig. 4. Double immunodiffusion pattern of lactoperoxidase against anti-lactoperoxidase IgY. Ab : anti-lactoperoxidase IgY, 1~6 : lactoperoxidase concentration(1. 1 mg/ml; 2. 0.5 mg/ml; 3. 0.25 mg/ml; 4. 0.125 mg/ml; 5. 0.062 mg/ml; 6. 0.031 mg/ml)

LPO IgY 항체를 중심 well에 넣고 LPO 항원을 1 mg/mL 농도부터 2배 희석법으로 희석하여 주변 well에 넣은 결과(Fig. 4)를 보면 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 침강선이 형성됨을 확인할 수 있었다.

Anti-LPO IgY 항체의 특이성을 측정하기 위해 ELISA와 Double immunodiffusion을 이용하여 α -lactalbumin, β -lactoglobulin, casein 및 lysozyme에 대한 교차반응을 측정한 결과를 Fig. 5, 6에 나타내었다. ELISA 방법에서는 anti-LPO IgY 항체는 단지 LPO와 반응을 하고 다른 단백질인 α -lactalbumin, β -lactoglobulin, casein 및 lysozyme하고는 교차반응을 하지 않았다. Double diffusion의 경우도 LPO 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 침강반응을 나타냈으나 각각 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 씩 들어간 α -lactalbumin, β -lactoglobulin, casein 및 lysozyme에 대해서는 침강반응을 나타내지 않았다. 본 실험에서 생산한 anti-LPO

IgY 항체는 ELISA와 double immunodiffusion 방법에서 α -lactalbumin, β -lactoglobulin, casein 및 lysozyme과 교차반응을 하지 않는 특이성이 높은 항체인 것으로 나타났다.

LPO를 정량하기 위한 indirect ELISA 방법의 조건을 잡기 위해 LPO의 coating 농도와 산란계에서 생산한 anti-LPO IgY 항체의 희석 농도를 측정한 것이다. LPO의 coating 농도를 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로부터 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 달리하여 anti-LPO IgY 항체 희석곡선을 비교한 결과이다. Fig. 7에서 coating 농도를 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 기준으로 해서 coating 농도의 감소 비율에 따라 405nm에 나타낸 ELISA 값을 상대적으로 비교해 보면 coating 농도가 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일 때 다른 coating 농도보다 상대적으로 높은 ELISA 값을 보였으며 또한 256,000배로 항체를 희석 시 ELISA 값을 비교했을 때도 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 coating한 경우가 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 coating한 것과 비슷한 수준의 낮은 ELISA 값을 나타내었다. 이런 결과는 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 coating 한 것이 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 coating한 것보다 비특이적 결합이 적은 것을 의미한다고 생각된다.

Sauer와 Foulkes(1985)에 의하면 면역분석은 면역반응의 환경조건과 항체와 항원의 상호작용이 표준곡선을 만드는데 영향을 주므로 항체가 면역반응에 미치는 noise factor와 non specific 반응을 줄이기 위해서는 항체농도와 항원농도에 따른 avidity 고려해야 한다고 하였다. 본 실험에서 indirect ELISA에서 coating하는 항원농도를 항체와 반응하는 avidity를 볼 때 LPO의 coating 농도가 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 비특이적 결합이 적으면서 민감도가 높은 표준곡선을 작성할 수 있다고 생각된다.

Fig. 8은 Microtiter plate에 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPO 농도로 coating 한 후 표준 LPO 농도를 측정하기 위해 anti-LPO IgY 항체 희석 배수를 1:4,000부터 1:32,000까지 달리하여 Indirect ELISA 곡선을 비교한 결과 LPO 농도가 0.01 ng/mL부터 10

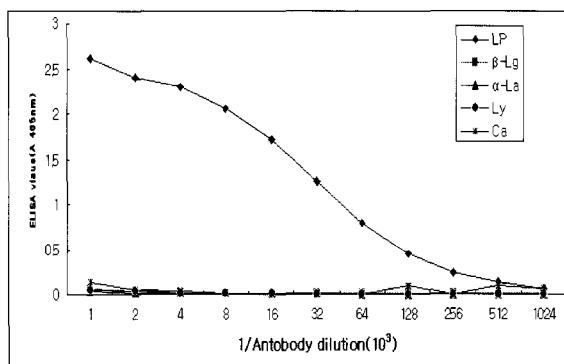


Fig. 5. Comparison of cross-reaction on the binding of antigen to anti-lactoperoxidase IgY. The anti-lactoperoxidase IgY activity is expressed as ELISA value (405 nm). Data are an average of duplicate measurements. LP : lactoperoxidase, β -Lg : β -lactoglobulin, α -La : α -lactalbumin, Ly : lysozyme, Ca : casein.

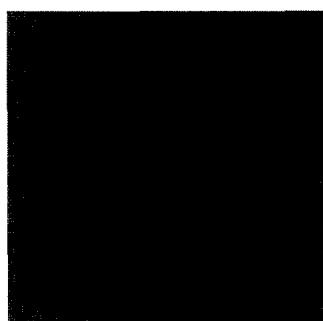


Fig. 6. Double immunodiffusion pattern of antigens against anti-lactoperoxidase IgY. Ab : anti-lactoperoxidase IgY 1 : lactoperoxidase (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 2 : lactoperoxidase (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 3 : α -Lactalbumin (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 4 : β -Lactoglobulin (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 5 : Casein (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 6 : Lysozyme (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

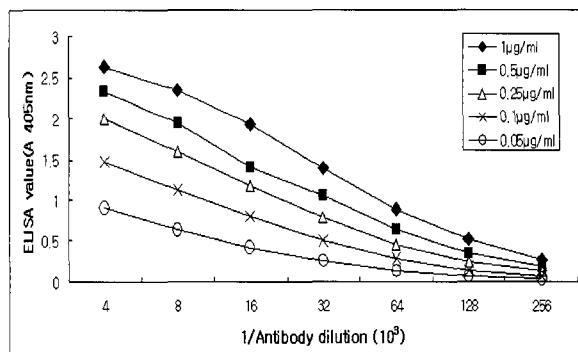


Fig. 7. Comparison of anti-lactoperoxidase IgY dilution curve with various amount of lactoperoxidase coated to the microtiter plate by indirect ELISA. ELISA value is measured at 405 nm. Data are an average of duplicate measurements.

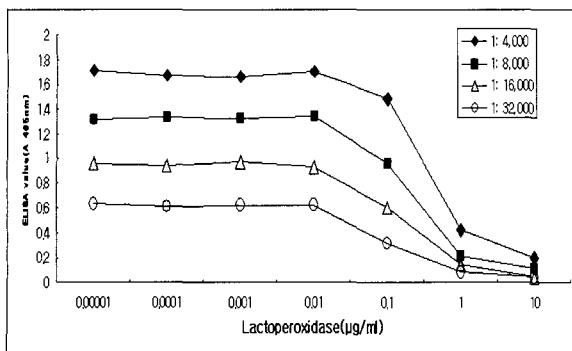


Fig. 8. Comparison of standard curve for the assay of lactoperoxidase by indirect ELISA using various concentration of anti-lactoperoxidase IgY. ELISA value is measured at 405 nm. Data are an average of duplicate measurements.

ng/mL까지는 4가지 곡선 모두 405 nm에서 비슷한 ELISA 값을 나타냈으나 LPO 농도가 10 ng/mL부터 ELISA 값이 감소되면서 곡선을 나타내고 있다. 4가지 항체희석에 따른 곡선에서 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPO농도를 기준으로 나타낸 ELISA 값을 비교해 보면 1:4,000의 경우는 0.2인데 반해 1:8,000은 0.08이며, 1:16,000과 1:32,000은 0.06과 0.05로 나타났다. 이것은 1:4000배의 항체 희석에서 나온 결과가 1:8,000에서 나온 결과보다 2.5배 이상 높은 ELISA 값을 보여 준 반면 1:16,000과 1:32,000배로 희석한 곡선에서 나타난 ELISA 값과는 거의 비슷한 수준을 나타내고 있다. 더우기 1:4,000배로 항체를 희석한 경우 비특이적 결합의 평균 ELISA 값이 0.18로 높게 나타났으나 1:8,000배의 항체 희석 경우 비특이적 결합의 ELISA 값의 평균은 0.05로 매우 적게 나타난 사실로 보아 1:4,000배로 항체를 희석한 곡선보다 1:8,000배로 항체를 희석한 곡선이 nonspecific binding이 적으로 LPO를 정량하는데 더 적합한 것으로 생각된다. 표준곡선을 작성 시 LPO 농도 측정에 영향을 주는 slope의 경사형태를 파악하기 위해 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 부터 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 나타난 평균 ELISA 값의 차이를 항체 농도를 1:8000, 1:16,000 및 1:32,000배로 희석한 곡선에서 보면 각각 1.206, 0.808 및 0.549로 나타났다. 이 중 가장 격차가 큰 기울기를 갖는 것은 1:8,000으로 항체를 희석한 곡선이다. 따라서 항체를 1:8000배로 희석한 곡선이 1:16,000배와 1:32,000배로 희석한 곡선보다 더 경사가 있는 기울기를 갖고 있어 LPO 농도를 정량 시 측정된 ELISA 값에 따라 더 민감하게 LPO의 농도 차이를 측정할 수 있다고 생각된다.

De Ceuninck 등(2001)에 의하면 면역분석의 측정 한계는 표준곡선에서 zero binding 시 평균 흡광도 값에서 -2 SD (Standard deviation)한 값이 낮은 농도에서 측정된 흡광도의 평균값에 $+2 \text{ SD}$ 을 한 값과 비교해서 overlap 되지 않는 농도를 표준곡선에서 detection limit로 결정된다고 하였다. 본 실

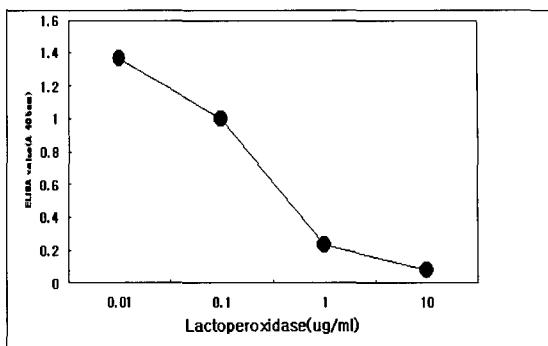


Fig. 9. Standard curve for the assay of lactoperoxidase by indirect ELISA using anti-lactoperoxidase IgY (1:8,000) and coating concentration of lactoperoxidase (0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). ELISA value is measured at 405 nm. Data are an average of duplicate measurements.

험에서 1:8000으로 희석한 곡선에서 zero binding 시 측정된 ELISA 값의 평균에 표준편차를 2배한 값은 1.464 ± 0.058 이며, LPO 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 측정된 평균 ELISA 값에 표준편차를 2배한 값은 1.367 ± 0.031 로 나타난 것을 고려해 보면 LPO 농도의 detection limit는 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 결정된다. 따라서 Fig. 9 는 LPO를 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 coating 하고 anti-LPO IgY 항체농도를 1:8,000으로 희석한 것을 이용하여 LPO 농도를 측정할 수 있는 Indirect ELISA 방법으로 표준곡선을 작성한 것으로 이 표준 곡선을 이용하면 LPO를 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 부터 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 측정 할 수 있다. Shin 등(2001)은 재조합 인간 LPO를 제조한 후 토끼에 주사하여 형성된 polyclonal 항체를 이용하여 ELISA을 개발한 후 만든 표준곡선은 LPO를 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 부터 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 측정할 수 있다고 보고하고 있다. 여기에 비추어 볼 때 산란계의 계란에서 분리된 anti-lactoperoxidase IgY 항체를 이용한 경우도 거의 토끼의 항체를 이용한 경우와 비슷한 민감도를 갖는 ELISA 방법이라고 생각된다. De Ceuninck 등(2001)에 의하면 계란 4개에서 분리한 IgY 항체를 이용하여 100,000마리의 guinea pig 혈액에서 YKL-40 (cartilage gp- 39)을 측정하는데 사용될 수 있으며 또한 적은 양의 항원으로 높은 면역성을 나타낸다고 보고하였다. Jenness(1982)에 의하면 양과 염소에서 분리된 lactoperoxidase는 우유의 LPO로 만든 antibovine LPO로 immunodiffusion을 실시한 결과 우유의 LPO와는 차이가 없다고 보고한 것에 비추어 볼 때 본 논문에서 생산한 anti-Lactoperoxidase IgY 항체로 양과 염소에 들어 있는 LPO를 측정하는데도 이용할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 이 본 연구에서 난황의 항체를 이용하여 개발한 Indirect ELISA 방법으로도 토끼의 항원을 이용한 ELISA 방법과 거의 비슷한 수준에서 LPO의 농도를 정량하는데 사용될 수 있는 가능

성이 있으며, 이 indirect ELISA 방법을 식품에 적용하기 위해 서는 좀더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

요 약

Lactoperoxidase(LPO)를 농도를 측정하기 위한 ELISA을 개발하기 위해 LPO로 면역시킨 갈색 산란계의 계란에서 형성된 anti-LPO IgY 항체를 분리 정제하고, 분리된 anti-LPO IgY 항체의 특이성을 ELISA 와 double immunodiffusion 방법으로 조사한 후 indirect ELISA 방법을 이용한 표준곡선을 만들었다. 분리정제된 anti-LPO IgY 항체의 titer는 1:520,000이며, ELISA와 double immunodiffusion 방법 모두에서 α -lactalbumin, β -lactoglobulin, casein 및 lysozyme하고는 교차반응을 하지 않고 LPO만 높은 특이성을 갖는 항체로 나타났다. Indirect ELISA 방법에서 LPO의 coating 농도는 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이며 anti-LPO IgY 최적 희석배수는 1:8,000으로 나타났다. Indirect ELISA 방법으로 LPO를 측정할 수 있는 표준곡선에서 민감도의 범위는 0.01~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 상지대학교 교내 학술연구비지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사합니다.

참고문헌

1. Akita, E. M. and Nakai, S. (1992) Immunoglobulin from egg yolk; isolation and purification. *J. Food Sci.* **57**, 629-634.
2. Andrews, A. T., Anderson, M., and Goodnough, P. W. (1987) A study of heat stabilities of number of indigenous milk enzymes. *J. Dairy Res.* **54**, 237-246.
3. Bjorck, L., Rosen, C., Marshall, V., and Reiter, B. (1975) Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against *Pseudomonas* and other gram negative bacteria. *Appl. Microbiol.* **30**, 199-204.
4. De Ceuninck, F., Pastoureaux, P., agnellet, S., Bonnet, J. and Vanhoutte, P. M. (2001) Development of an enzyme-linked immunoassay for the quantification of YKL-40(cartilage gp-39) in guinea pig serum using hen egg yolk antibodies. *J. Immunol. Methods* **252**, 153-161.
5. Clarke, J. R., Marquardt, R. R., Frohlich, A. A. and Pitura, R. J. (1994) Quantification of ochratoxin A in swine kidneys by enzyme-linked immunosorbent assay using a simplified sample preparation procedure. *J. Food Protect.* **57**, 991-995.
6. De wit, J. N. and van Hooydonk, A. C. M. (1966) Structure, function and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. *Neth. Milk Dairy J.* **50**, 227-244.
7. Earnshaw, R. G., Banks, J. G., Derise, D., and Francotte, C. (1989) The preservation of cottage cheese by an activated lactoperoxidase system. *Food Microbiol.* **6**, 285-288.
8. Farkey, N. Y. and Imafidon, G. I. (1995) Thermal denaturation of indigenous milk enzyme. In *Heat Induced Change in Milk*, 2nd ed., International Dairy Federation, Brussels, I. 9501, pp. 331-348,
9. Frazier, W. C. (1988) Preservation by drying In *Food Microbiology*, Frazier, W. C.(ed), McGraw-Hill, NY, USA, pp. 125-131.
10. Gassmann, M., Thömmes, P., Weiser, T., and Hübscher, U. (1990) Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.* **4**, 2528-2532.
11. Griffiths, M. W. (1986) Use of milk enzymes as indices of heat treatment. *J. Food Prot.* **49**, 696-705.
12. Jenness, R. (1982) Inter-species comparison of milk protein. In *Developments in dairy chemistry-I*, Fox, P. F.(ed) App. Sci. Pub. London, England, pp.87-114.
13. Kamau, D. N., Doores, S., and Pruitt, K. M. (1990) Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2711-2716.
14. Kennedy, M., O'rourke, A. L., McLay, J., and Simmonds, R. (2000) Use of ground beef model to assess the effect of the lactoperoxidase system on the growth of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in red meat. *Inter. J. Food Microbiol.* **57**, 147-158.
15. Kim, C. H., Lee, K. W., Baick, S. C., and Moon, J. W. (1996) Inhibition of acid production in gel type yogurt by the lactoperoxidase system. *Korean J. Food Technol.* **28**, 736-742.
16. Knekt, P., Jarvinen, R., Dich, J., and Hakulinen, T. (1999) Risk of colorectal and other gastro-intestinal cancers after exposure to nitrate, nitrite and N-nitroso compounds: a follow-up study. *Int. J. Cancer* **80**, 852-856.
17. Larsson, A., Balow, R., Lindahl, T. L., and Forsberg, P. (1993) Chicken antibodies: taking advantage of evolution - a review. *Poult. Sci.* **72**, 1807-1812.
18. Lee, S. B., Choi, S. H., and Baek D. Y. (1999) Immunological

- characteristics of anti-lactoferrin IgY and immunoassay of lactoferrin in milk. *Korean J. Dairy Sci.* **21**, 299-304.
19. Lee, S. B., Mine, Y., and Stevenson R. M. W. (2000) Effects of hen egg yolk immunoglobulin in passive protection of rainbow trout against *Yersinia ruckeri*. *J. Agri. Food Chem.* **48**, 110-115.
20. Nakada, M., Dosako, S., Hirano, R., Ooka, M., and Nakajima, I. (1966) Lactoperoxidase suppresses acid production in yoghurt during storage under refrigeration, *Int. Dairy J.* **6**, 33-42.
21. Ouchterlony, O. and Nilsson, L. A. (1978) Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In *Handbook of Experimental Immunology*, 3rd. ed., Weir D. M.(ed.), Chapter 19. Blackwell Sci. Publ., Oxford.
22. Pellegrino, L., Resmini, P., and Luf, W. (1995) Assessment(indices) of heat treatments of milk, In *Heat Induced Change in Milk*, International Dairy Federation S. I. 9501(2nd ed.), Brussels, pp. 695-705.
23. Reiter, B. (1985) The lactoperoxidase system of bovine milk. In *The lactoperoxidase System, Chemistry and Biological Significance*, Pruitt, K. M. and Tenovuo, J. O.(eds), Marcel Dekker, NY, pp. 123-142.
24. Sauer, M. J. and Foulkes, J. A. (1985) Principles of enzyme immunoassay. In *Immunoassay in Food Analysis*, Morris, B. A. and Clifford, M. N.(eds). Elsevier Applied Sci. Publ., London and NY, pp. 53-72.
25. Shin, K., Hayasawa, H., and Lönnerdal, B. (2001) Purification and quantification of lactoperoxidase in human milk with use of immunoabsorbents with antibodies against recombinant human lactoperoxidase. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 984-989.
26. Tenovuo, J. O. (1985) The peroxidase system in human secretions. In *The lactoperoxidase System, Chemistry and Biological Significance*. Pruitt, K. M. and Tenovuo, J. O.(eds), Marcel Dekker, NY, pp. 101-122.
27. Wolfson, L. M., Sumner, S. S., and Froning, G. W. (1994) Inhibition of *Salmonella thphimurium* on poultry by the lactoperoxidase system. *J. Food Saf.* **14**, 53-62.

(2004. 2. 18. 접수 ; 2004. 5. 24. 채택)