



## 한우 체지방 감소 쇠고기 생산을 위한 복강 및 피하지방 항체 개발

최창원 · 김유현 · 김성진 · 송만강<sup>1</sup> · 권응기 · 오영균 · 홍성구 · 최성호<sup>1</sup> · 백경훈\*  
농촌진흥청 국립축산과학원, <sup>1</sup>충북대학교 축산학과

### Development of Polyclonal Antibodies to Abdominal and Subcutaneous Adipocytes for Fat-Reduced Hanwoo Beef Production

Chang Weon Choi, Yu Hyun Kim, Sang Jin Kim, Man Kang Song<sup>1</sup>, Eung Gi Kwon, Young Kyoon Oh, Seong Koo Hong, Seong Ho Choi<sup>1</sup>, and Kyung Hoon Baek\*

National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

<sup>1</sup>Department of Animal Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

#### Abstract

This study aimed to develop polyclonal antibodies to regional inedible adipocytes of Korean native cattle (Hanwoo) and investigate cross-reactivity of the antibodies. Patterns in plasma membrane proteins (PMPs) from abdominal and subcutaneous adipocytes of Hanwoo isolated by collagenase digestion were investigated using SDS-PAGE. As antigens, abdominal and subcutaneous adipocyte PMPs of Hanwoo were injected to sheep 3 times at 3 wk intervals for passive immunization, and non-immunized serum and antisera were collected before and after the injections. Titers of the antisera obtained from sheep and their cross-reactivities with heart, kidney, liver, lung, muscle, and spleen of Hanwoo were determined by ELISA. Isolation and culture of abdominal and subcutaneous adipocytes of Hanwoo were performed for analysing LDH concentration. Based on the SDS-PAGE analysis, specific proteins of PMPs in abdominal and subcutaneous adipocytes appeared despite rather similar patterns between both adipocytes. At the level of 1:1,000 dilution, little antibody reactivity appeared in non-immunized serum whereas the antisera had relatively strong reactivity up to the level of 1:128,000 and 1:64,000 dilution. These findings may indicate that strong antibodies against adipocyte PMPs can be developed using an immunological approach. Extremely low reactivities of abdominal and subcutaneous adipocyte antisera were detected with PMPs of the organs. Both antisera strongly reacted with each adipocyte PMPs and showed statistically ( $p < 0.01$ ) higher cross-reactivities compared with non-immunized serum. In conclusion, these results may indicate that the present polyclonal antibodies against regional inedible adipocyte PMPs are well developed and have safety in cross-reactivities with body organs. Further studies on *in vivo* cross-reactivity and fat reduction of the antibodies against abdominal and subcutaneous adipocytes PMPs of Hanwoo should be required for inedible fat-reduced high quality beef production.

**Key words :** Hanwoo, antibody, fat-reduced beef, abdominal, adipocyte

#### 서론

지난 수십년 간 한우의 육량과 육질을 개선하려는 시도는 다양하게 이루어져 왔다(Choi *et al.*, 1997; Baek, 2005; Kim *et al.*, 2007). 생리학적으로 볼 때 체지방 형성의 마지막 단계로 축적되는 근내 지방은 현행 고급육 생산기법에서 초점을 맞추고 있는 부분이다(Baek, 2005). 따라서, 고급육 생산을 위해서는 한우의 장기 사양이 불가피한 실

정인데, Flint(1992)는 가축 체내 과도한 불가식 지방 함량은 식육 산업에서 일차적으로 고려해야 할 중요한 부분이라고 하였다. 이에 따라 불가식 지방을 감소시켜 생산비를 절감하고 지방 함량이 낮은 육제품을 생산하기 위한 많은 방법들이 연구되어 왔다.

가축내 지방 축적 문제를 근본적으로 해결하기 위해 실시된 육종학적 방법은 전체 지방 함량은 감소시키나 무리한 등지방의 감소로 육질에는 오히려 부정적인 영향을 미쳤다(Dickerson, 1985). 미국을 포함하는 이른바 축산선진국에서 유전자재조합 기술을 통해 생산한 성장호르몬이 널리 이용되어져 왔는데, 실제 가축의 증체량을 증가시키

\*Corresponding author : Kyung Hoon Baek, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea. Tel: 82-31-290-1653, Fax: 82-31-290-1660, E-mail: khbaek@rda.go.kr

고 사료효율을 개선하는 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Moloney, 1990; Chikhou *et al.*, 1993). 하지만 이 기술은 외부물질의 가축체내 잔류 가능성 및 인체에 대한 안전성 등이 확보되지 않아 사용이 엄격히 규제되고 있으며, 실제 유럽연합을 비롯한 여러 국가에서는 호르몬 처리 육제품의 수입을 전면금지하고 있다(Moloney, 1995). 따라서 가축 체지방 조절에 관한 연구는 소비자들이 믿고 선호할 수 있는 안전한 방향으로 진행되어져 왔으며, 이에 부응하여 면역학적 기법을 이용한 체지방 조절기술이 영국을 중심으로 소개되었다. 면역학적 기법을 이용한 체지방 조절기술은 크게 somatotropin에 대한 항체처리 기술, 성장호르몬 유사물질의 개발, 그리고 지방세포에 직접적으로 작용하는 지방세포에 대한 항체의 개발로 분류해 볼 수 있는데(Flint, 1994), 현재까지 흰쥐(Flint *et al.*, 1986; Baek *et al.*, 2000), 한우(Choi *et al.*, 1997), 면양(Nassar *et al.*, 1991a, b), 돼지(Kestin *et al.*, 1993; Choi and Lee, 1996; Choi *et al.*, 1998), 닭(Dong *et al.*, 1991; Butterwith *et al.*, 1992) 등 다양한 축종을 대상으로 연구가 진행되었다.

하지만 현재까지의 연구들은 항체의 생산 및 항체가 가지는 지방세포 독성효과 등에 초점이 맞춰져 왔었기 때문에 본 기술의 상용화를 위해서는 반드시 해결해야 할 문제들이 존재한다. 특히 우리나라의 쇠고기 등급 및 소비자 선호 특성상 고급육의 판별 기준이 되는 근내지방은 유지하면서 불가식 지방인 복강 및 피하지방만을 선택적으로 감소시키는 이른바 지방부위별 선택적 감소기술의 개발이 요구되고 있으며, 개발된 항체의 뇌, 심장, 신장, 간장, 비장, 폐, 근육 등 주요 장기와 조직 세포 구성 단백질에 대한 교차반응 및 이로 인한 장기 조직의 손상 등을 대표적으로 꼽을 수 있다. 이러한 지방 및 타장기 교차반응성은 일차적으로 기존의 연구들이 전체 지방조직 또는 불특정 지방부위에서 원형질막 단백질을 분리하여 생산한 항체를 이용하였기 때문에 발생한 것으로 추측된다(Choi *et al.*, 1997, 1998).

따라서, 본 연구는 불가식 체지방이 감소된 한우쇠고기 생산을 위해, 현재까지 나타난 다클론 항체들의 단점을 극복하는 부위별 지방 특이 다클론 항체를 개발하고자 실시되었다.

## 재료 및 방법

### 지방 및 장기 세포 원형질막 단백질 분리 및 패턴 분석

#### 1) 한우 지방세포 원형질막 단백질 분리

본 연구에서 항원으로 사용될 한우 복강 및 피하 지방 세포 원형질막 단백질은 특이한 질병유무가 발견되지 않은 건강한 한우 거세 및 비거세우 26두의 도축시 Kestin

등(1993)의 방법을 이용하여 약 3개월에 걸친 반복적인 수집과정을 통해 분리하였다. 도축은 국립 축산과학원 도축 관행에 따라 비거세우 24.1±1.16개월 및 거세우 24.9±4.18개월령에 실시되었으며, 도축당시 체중은 비거세우 561.94±19.60, 거세우 553.40±20.34 kg이었다. 도축장에서 도축 즉시 굳지 않은 한우 복강 및 피하지방 조직을 채취하여 0.9% saline(70±5°C)에 넣어 지방조직이 굳지 않게 유지하면서 실험실로 이동했다. 지방조직에서 혈관 및 결합조직 등을 최대한 제거하면서 가위로 잘게 세절한 후, digestion media(DMEM(Hyclone SH30243.01), 0.1% collagenase (Sigma, C6885), 30% bovine serum albumin(BSA, Sigma A2153))와 지방의 비율을 2:1로 하여 shaking water bath에서 collagenase digestion(42°C, 90 min)을 실시하였다. Digestion 후 collagenase로 인해 유리된 지방세포들만을 따로 취하기 위해 250 µm 나일론 망으로 걸러주었으며, 37°C에서 5분간 정치하여 미성숙한 지방세포들로 구성된 하층을 제거함으로써 지방입자를 함유하고 있는 성숙한 지방세포들을 선택적으로 추출하였다. 그 후 보다 순수한 세포를 얻기 위해 collagenase를 제거한 digestion media (washing media)로 2-3회 세척하였다.

분리된 지방 세포층과 membrane extraction medium (MEM : 0.25 M sucrose, 0.01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM EGTA, 200 mL distilled water, pH 7.4)을 1:2의 비율로 혼합한 후 50 mL tube에 30 mL씩 넣고, 0.2 M phenyl methyl sulphonyl fluoride(PMSF)를 각 tube당 60 µL씩 첨가한 후 손으로 격렬히 흔들어서 지방세포를 파괴시켰다. 3,000 rpm에서 5분간 원심분리한 뒤 얼음 통에 약 10분간 정치시켜 지방세포 파괴로 생성된 중성지방 층을 조심스럽게 제거한 뒤, 하층액을 4°C, 110,000×g에서 1시간동안 초고속 원심분리 하였다. 원심분리 후 생성된 pellet들 중 원형질막 단백질만을 따로 추출하기 위해 pellet을 32% sucrose media와 함께 glass grinder에서 충분히 현탁하고, 현탁액의 sucrose gradient를 유도하기 위해 다시 초고속 원심분리(4°C, 148,000×g, 1 hr)하였다. 원심분리 후 원심분리관에 생성된 단백질 밴드만을 따로 취하였으며, 순수한 원형질막 단백질을 정제해내기 위해 단백질 밴드를 MEM으로 잘 혼합한 뒤 다시 초고속 원심분리(4°C, 148,000×g, 1 hr)하여 최종 pellet(원형질막 단백질)을 분리하였다. 분리된 pellet의 양에 따라 적당량의 MEM을 첨가한 뒤 DC Protein assay kit(Bio-rad 500-0116, USA)를 이용해 단백질 농도를 측정 한 뒤, 본 실험의 항원으로 사용될 때 까지 -20°C에서 보관하였다.

#### 2) 한우 장기조직 원형질막 단백질 분리

한우의 심장, 신장, 간장, 폐, 근육 및 비장 원형질막 단백질 분리는 Lo 등(1976)의 방법을 다소 변형하여 실시하였다. 도축장에서 장기조직을 채취하여 50 mL tube에 5 g

씩 넣고 MEM 25 mL와 0.2 M PMSF 60  $\mu$ L를 첨가한 뒤 homogenizer(WiseMix HG-15D, 대한과학, 한국)를 이용하여 분쇄하였다. 분쇄한 현탁액을 새로운 50 mL tube에 옮겨 넣고 4°C, 3,000 rpm, 30분간 원심분리한 뒤, 상층액만 취하여 다시 4°C, 110,000 $\times$ g에서 1시간동안 초고속 원심분리하였다. 원심분리 후 pellet을 32% sucrose media와 함께 glass grinder에 넣고 충분히 현탁한 후 sucrose gradient를 위해 다시 초고속 원심분리(4°C, 148,000 $\times$ g, 1 hr)를 실시하였다. 원심분리관에 형성된 protein band를 확인한 뒤, 조심스럽게 band만을 취하고 MEM을 첨가한 뒤 최종적으로 4°C, 148,000 $\times$ g에서 1시간동안 초고속 원심분리하여 단백질 pellet을 분리하였다. 분리된 pellet의 량에 따라 적당량의 MEM을 첨가한 뒤 지방세포 원형질막 단백질과 동일하게 DC Protein assay kit(Bio-rad 500-0116, USA)를 이용해 단백질 농도를 측정하였다. 본 연구에서 분리된 한우 장기 원형질막 단백질은 한우 부위별 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항혈청과의 교차반응성 측정 시 사용되었으며, 사용 시까지 -20°C에서 보관하였다.

### 3) 한우 지방세포 원형질막 단백질 패턴 분석

부위별로 추출한 한우 지방세포(복강 및 피하) 원형질막 단백질의 패턴을 비교해 보기 위해 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 실시하였다. Gel의 제조 및 전기영동 등 일련의 과정은 Mini-PROTEAN<sup>®</sup> 3 Cell(Bio-rad, USA)을 사용하였으며, Instruction Manual에 따라 단백질을 분리하였다. SDS-PAGE로 전개한 gel에 대한 분석은 Quantity-One(Bio-Rad, USA) program을 이용해 matched test를 실시하였으며, all lane on 상태에서 rolling disk size를 50으로 설정해 분석하였다.

### 한우 부위별 지방 특이 항체의 생산

한우 부위별 지방 특이 항체의 생산을 위한 면역주사는 Baek 등(2005)의 방법에 따라 실시하였다. 수컷 면양(Corriedale, 60)의 피하 3 부위(목 뒷부분과 양쪽 서혜부)에 지방세포 원형질막 단백질을 면역주사 하였으며, 최초 면역주사 이후 2차례 더 boosting 면역주사를 3주 간격으로 실시하였다. 1차 접종에는 지방세포 원형질막 단백질 1 mL(250  $\mu$ g/mL), Freund's incomplete adjuvant(Sigma F5881, USA) 1,750  $\mu$ L 그리고 Freund's complete adjuvant(Sigma F5506, USA) 250  $\mu$ L를 3-way stopcock(성원 메디칼(주), 대한민국)을 사용해 충분히 혼합한 뒤 1 mL씩 나누어 전술한 피하 3부위에 주사하였으며, 2차와 3차 접종에는 지방세포 원형질막 단백질의 농도를 반으로 줄인 항원 1 mL(125  $\mu$ g/mL)에 Freund's incomplete adjuvant만 2 mL 첨가하여 전술한 방법과 동일하게 면역 접종하였다.

1차 면역접종 전 면양의 경정맥을 통해 혈액을 채취한 뒤 상온에서 1시간 정지시켜 혈액을 응고시키고, 2,800

rpm에서 30분간 원심분리하여 비면역혈청을 분리하였다. 또한, 마지막 면역접종이 끝난 후 12일째에 채혈한 후 비면역혈청 분리 시와 동일한 방법으로 항혈청(항체)을 분리하였다. 위의 방법으로 생산한 한우 부위별 지방에 대한 항혈청들은 각각 한우 복강지방 항체(NIAS-H101) 및 피하지방 항체(NIAS-H201)로 명명하였다. 생산된 비면역혈청 및 항혈청들은 사용 전까지 -80°C에서 냉동보관 하였다.

### 항체의 역가, 타장기 cross-reactivities 및 세포독성 검사

#### 1) 한우 지방 특이 항체의 역가 측정

본 연구에서 생산한 한우 부위별 지방 항체의 역가는 Kestin 등(1993)과 Choi 등(1997)의 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)법에 따라 측정하였다. 역가 측정 하루 전 한우 복강 및 피하지방 원형질막 단백질을 1  $\mu$ g/mL의 농도로 TBS(Tris-buffered saline, pH 7.2: 50 mM Tris, 154 mM NaCl)에 희석한 뒤 96 well plate(Costar 3590, USA)에 100  $\mu$ L씩 loading하여 plate 바닥에 완전히 흡착시키고 24 hr 정지시켰다. Plate의 상층액을 제거한 뒤 TBS-Tween(0.1% Tween 20) 200  $\mu$ L를 넣어 3회 세척한 후 비면역혈청 및 항혈청을 1차 항체로서 100  $\mu$ L씩 주입하여 항원과 결합시켰다. 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBS-Tween으로 3회 세척하여 비특이적 결합들을 최대한 방지해 주었다. 그 후 2차 항체로 anti-sheep IgG (Sigma A5187, USA)를 1:10,000배 희석하여 각 well에 100  $\mu$ L씩 주입하고 상온에서 다시 2시간동안 반응시켰다. 다시 TBS-Tween으로 3회 세척한 후 alkaline phosphatase substrate에 4-NP(Sigma 1040, USA)를 섞은 substrate buffer를 250  $\mu$ L씩 첨가한 뒤, 암실에서 반응이 일어날 때까지(약 15분 소요) 발색시켰다. 0.5 M NaOH을 각 well 당 50  $\mu$ L씩 첨가하여 발색 반응을 정지시킨 후 microplate reader(Benchmark plus model 680, Bio-rad, USA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2) 한우 지방 특이 항체의 타장기 cross-reactivities

본 연구에서 생산한 부위별 지방 특이항체가 한우의 주요장기(심장, 신장, 간장, 폐, 근육 및 비장) 원형질막 단백질과 나타내는 교차반응성 즉, 타장기 cross-reactivities는 Baek 등(2000)의 방법에 따라 ELISA법으로 실시하였다.

실험 전일 지방세포를 포함한 한우 주요장기 원형질막 단백질들을 1  $\mu$ g/mL의 농도로 TBS와 희석한 뒤 각 well 당 100  $\mu$ L씩 96 well plate에 주입하여 항원이 plate 바닥에 충분히 coating되도록 해 주었다. 전체적인 실험의 방법은 지방 특이 항체의 역가 측정법과 동일하게 진행되었으며(예 : 1차 또는 2차 항체의 종류, 1차 및 2차 항체의 농도 및 양, substrate의 종류 등), 암실에서 약 30분간 발색반응시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3) 한우 지방세포 배양 및 항체 세포독성

한우 부위별 지방세포 원형질막에 대한 특이항체들(NIAS-H101 및 NIAS-H201)의 *in vitro* 세포배양 및 세포독성 효과 검증을 위해 Back(2003)의 방법에 따라 세포배양 후 LDH(lactate dehydrogenase) assay를 실시하였다.

### 통계

한우 부위별 지방 특이 항체의 역가 연구의 통계분석은 SAS 통계 package에 포함된 일반선형모형(general linear model)로 상호작용 효과가 있는 이원 분산분석을 실시하였고, 통계 모형을 다음과 같다.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

여기에서  $\mu$ 는 전체평균,  $\alpha_i$ 는  $i$ 번째 처리구간의 효과,  $\beta_j$ 는  $j$ 번째 희석배율에 따른 효과,  $(\alpha\beta)_{ij}$ 는  $i$  처리구와  $j$  희석배율간의 상호작용,  $Y_{ijk}$ 는 관측된 흡광도를 나타내며,  $\epsilon_{ijk}$ 는 각각의 실험에서의 오차를 나타낸다.

역가, 교차반응성 및 세포독성 등 각각의 자료에 대한 유의성 검증은 Duncan(1955)의 다중검정법으로 95% 신뢰 수준에서 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 한우 부위별 지방세포 원형질막 단백질 패턴 비교

한우 복강 및 피하지방세포로부터 sucrose gradient를 통해 분리한 세포 원형질막 단백질의 패턴을 비교해 보기 위해 SDS-PAGE를 실시한 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같다.

SDS-PAGE를 통해 확인한 복강 및 피하지방세포의 원형질막 단백질들은 유사한 분자량의 단백질들도 존재하고 있었으나(복강 57.24와 피하 54.71 kDa 및 복강 22.54와 피하 22.70), 특이적으로 한우 피하지방세포 원형질막에만 존재하는 단백질이 있음을 확인할 수 있었다(170.53, 100.39, 60.78 및 13.24 kDa). 이미 특정 지방세포 원형질막 단백질은 동일한 축종에서 뿐만 아니라 서로 다른 축종 간에도 공통적으로 존재하고 있음이 밝혀졌는데(Tume, 1991), 특히 서로 다른 세 종(소, 토끼 및 흰쥐)의 지방세포 원형질막 단백질 중 74 kDa에서 79 kDa 크기 사이에 공통적으로 존재하는 당단백질이 있다고 알려져 있다(Kawai and Spiro, 1977a, b). 또한, 면양의 지방세포 원형질막 단백질 중 70, 106 및 110 kDa 크기의 단백질들은 돼지의 44, 46 kDa 부근의 지방세포 원형질막 단백질 구성과 매우 유사하였으며, 면양 지방세포에 대한 항체를 이용하여 실제 교차반응성을 확인해 본 결과 면양뿐만 아니라 돼지의 지방세포 원형질막에서도 항원-항체 반응이 일어남을 확인할 수 있어 축종 간 동일한 단백질의 존재를 시사하였다(Nassar and Hu, 1991b). 본 연구에서는 Fig. 1의 ‘\*’로 표기된 부

분에서 복강지방에는 없지만 피하지방에서만 특이적으로 존재하는 단백질을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 부위별 지방 특이 항체의 생산 시 서로 다른 두 항체 간 특이성을 나타내게 해 줄 항원성 단백질의 존재를 시사하는 것으로 사료된다. 본 연구에서는 한우 지방 부위별로 서로 다른 특성을 가지고 있는 다클론 항체들의 생산이 1차적 목표이기 때문에, SDS-PAGE를 통해 나타난 부위별 지방세포 원형질막 단백질의 서로 다른 패턴만으로도 충분히 지방 부위에 따라 특이적으로 작용하는 항체의 생산이 가능한 것으로 판단된다. 하지만 SDS-PAGE와 같은 1차원적 전기영동만을 통해서만 복강지방세포의 원형질막 단백질과 피하지방세포 원형질막 단백질이 차이가 있다고 단정 짓기에는 무리가 있으며, 향후 부위별 특이 항체가 서로 다른 부위에 선택적으로 작용할 수 있는 반응 기전의 이해를 위해서라도 보다 세분화된 단백질 연구(예: 2-D electrophoresis 등을 통한 특이 단백질 screening)가 필요할 것으로 생각된다.

### 특이 항체의 역가 측정 및 타장기 안전성 연구

#### 1) 한우 부위별 지방 특이 항체의 역가

Fig. 2는 본 연구에서 생산한 한우 복강지방세포 특이 항체의 역가를 측정하기 위해 항원 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 대해 항혈청을 1:1,000배부터 1:128,000배까지 순차적으로 희석하여 처리한 ELISA 결과로, 1:1,000배의 희석배율에서 감지된 한우 복강지방세포에 대한 항혈청의 역가를 백분율로 계산한 결과를 나타낸 것이다.

희석배율과 처리에 따른 이원분산분석을 실시해 본 결과, 항원-항체 반응으로 나타난 흡광도는 희석배율에 따라 유의적인 차이를 나타내었으며( $p < 0.001$ ), 처리에 따른 유의적인 차이도 나타내었다( $p < 0.001$ ). 또한 희석배율과 처리간의 상호작용도 유의적인 것으로 나타났다( $p < 0.001$ ). Fig. 2에서 나타난 바와 같이 항원을 주사하지 않은 비면역혈청과 비교하여 한우 복강지방세포 특이 항체는 한우 복강지방세포에 대해 전 희석배율에서 유의적으로 높은 항원-항체 반응을 나타내었다(1:1,000에서 1:64,000배 희석배율까지는  $p < 0.01$ , 1:128,000배 희석배율에서는  $p < 0.05$ ). 특히 비면역혈청의 경우 1:1,000배 이상의 희석배율에서는 거의 반응이 감지되지 않았으나, 복강지방 항체의 경우는 1:128,000배의 희석배율에서도 반응이 감지되었다. 한우 피하지방세포 특이 항체의 역가 또한 ELISA법으로 동일하게 측정되었으며(Fig. 3), 복강지방세포 특이항체와 동일하게 희석배율( $p < 0.001$ ), 처리( $p < 0.001$ ) 및 상호작용( $p < 0.001$ ) 모두 유의적인 것으로 나타났다. 한우 피하지방세포 특이 항체는 한우 피하지방세포에 대해 1:64,000배 희석배율까지 유의적으로 높은 반응력을 나타내었으나(1:1,000에서 1:32,000배 희석배율까지는  $p < 0.01$ , 1:64,000

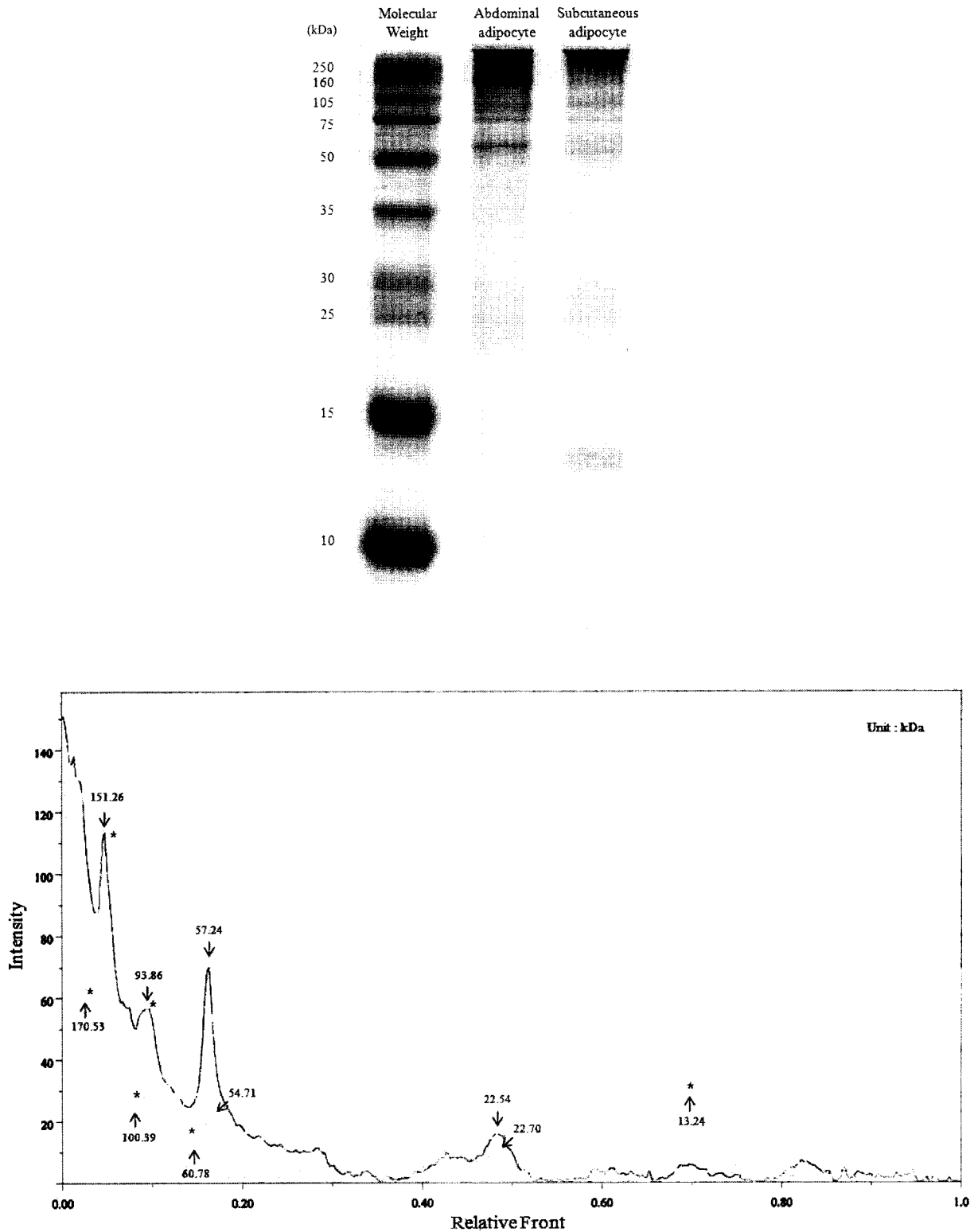


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of plasma membrane proteins isolated from abdominal and subcutaneous adipocytes of Hanwoo (Korean native cattle). Each protein patterns was measured with the quantity-one program.

배 희석배율에서는  $p < 0.05$ ), 희석배율에 따라 역가가 순차적으로 감소하는 경향을 나타내면서 1:128,000배 희석배율에서는 항혈청과 비면역혈청간의 역가 차이는 나타나지 않았다.

Flint 등(1986)은 흰쥐의 지방세포에 대해 생산한 항체가 1:27,000배의 희석배율에서도 강한 반응을 나타낸다고 보고하였으며, 돼지 지방세포에 대한 다클론 항체 역시 1:27,000배의 희석배율에서도 감지할 수 있을 만큼 높은

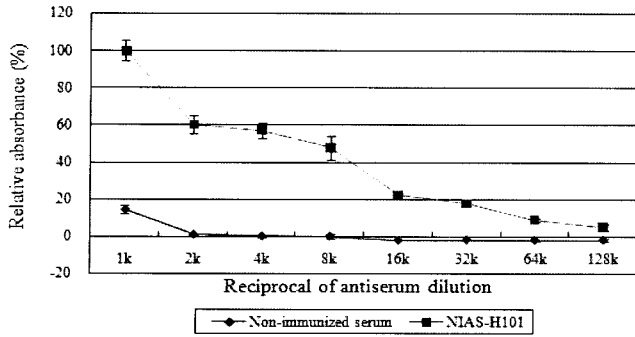


Fig. 2. Reactivity of non-immunized serum and antiserum against Hanwoo abdominal adipocyte plasma membrane proteins (NIAS-H101) as detected by ELISA. Means±S.E. (n=6).

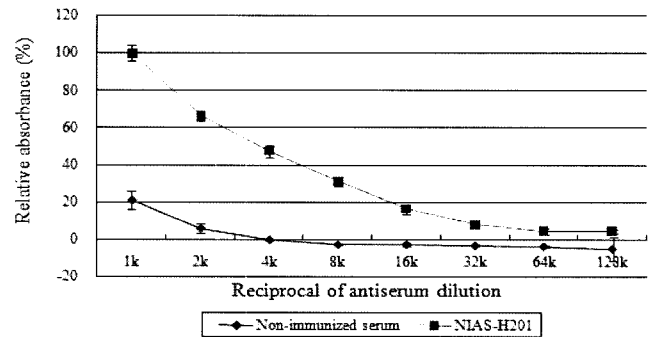


Fig. 3. Reactivity of non-immunized serum and antiserum against Hanwoo subcutaneous adipocyte plasma membrane proteins (NIAS-H201) as detected by ELISA. Means±S.E. (n=6).

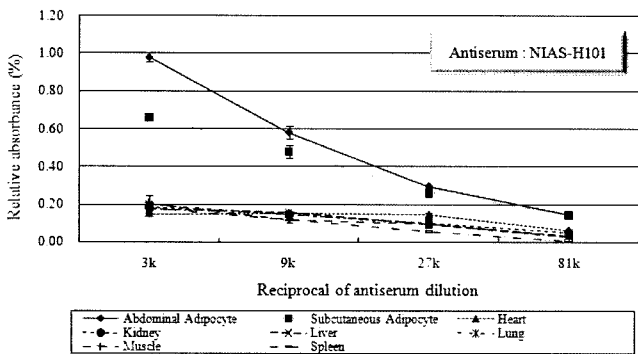


Fig. 4. Cross-reactivity of antiserum against Hanwoo abdominal adipocyte plasma membrane proteins (NIAS-H101) with abdominal and subcutaneous adipocytes, heart, kidney, liver, lung, muscle, and spleen of Hanwoo. Means±S.E. (n=6).

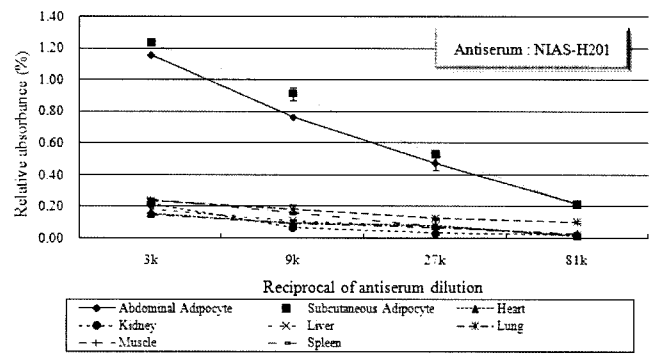


Fig. 5. Cross-reactivity of antiserum against Hanwoo subcutaneous adipocyte plasma membrane proteins (NIAS-H201) with abdominal and subcutaneous adipocytes, heart, kidney, liver, lung, muscle, and spleen of Hanwoo. Means±S.E. (n=6).

역가를 나타내었다고 보고하였다(Kestin *et al.*, 1993). 국내에서는 돼지 지방세포에 대해 생산한 항체가 1:32,000 배의 희석배율에서도 감지할 수 있었다고 하였으며(Choi and Lee, 1996), 특히 한우의 경우, 최대 1:81,000배의 희석배율에서도 역가를 감지할 수 있는 항체를 생산하였다고 보고하였다(Choi *et al.*, 1997). 따라서 기존의 보고된 항체의 역가와 단순 비교해 보았을 때 본 연구에서 개발한 한우 부위별 지방 특이 항체는 지방세포에 대해 매우 강한 결합력을 가진 항체임을 확인할 수 있었다.

2) 한우 부위별 지방 특이 항체의 타장기 안전성 연구  
한우 복강지방 특이항체 및 피하지방 특이항체를 이용한 타장기 안전성 연구 결과 또한 ELISA법으로 측정되었으며 각각 Fig. 4와 5에 나타난 바와 같다. 또한 Table 1과 2는 타장기 안전성 연구 결과의 실측치(O.D.)를 제시한 것이다.

역가 측정시와 동일하게 이원분산분석을 실시해본 결과, 두 실험결과는 공히 항원-항체반응으로 나타난 주요장기별 흡광도가 희석배율에 따라 유의적인 차이를 나타내

었으며( $p < 0.001$ ), 처리에 따라서도 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났다( $p < 0.001$ ). 또한 희석배율과 처리간의 상호작용도 유의한 것으로 나타났다( $p < 0.001$ ).

Fig. 4와 Table 1에서 나타난 바와 같이 Duncan 다중검정(유의수준 95%)을 이용하여 유의성 분석을 실시한 결과, 복강지방 특이항체는 주요장기들과는 달리 지방세포에 대해 전 희석배율에서 유의적으로 강한 항원-항체 반응을 나타내었다. 또한 한우 복강지방 특이 항체는 3k 및 9k 희석배율에서 피하지방세포에 비해 유의적으로 높은 반응을 나타내어 부위별 지방세포 간에도 차이가 있는 것으로 나타났다. 복강지방 특이 항체는 주요장기(심장, 신장, 간장, 폐, 근육 및 비장) 세포 원형질막 단백질과 1:3,000 배 희석배율에서 미약한 반응이 나타남을 확인할 수 있으나, 이는 다클론 항체의 일반적 특성으로 장기와 항체의 직접적인 교차반응이 아니더라도 항체 생산 축(畜)의 체내 단백질 등의 비특이적 반응으로도 나타날 수 있는 수준이라 할 수 있다. Fig. 5는 피하지방 특이항체와 주요장기 간의 교차반응성을 측정된 결과이며 실측치는 Table 2에 제시한 바와 같다. Fig. 5와 Table 2에 나타난 바와 같

**Table 1. Optical density of antiserum against Hanwoo abdominal adipocyte plasma membrane proteins (NIAS-H101) with abdominal and subcutaneous adipocytes, heart, kidney, liver, lung, muscle, and spleen of Hanwoo**

Items	3 k	9 k	27 k	81 k
Abdominal adipocyte	0.981 <sup>1)a</sup>	0.581 <sup>a</sup>	0.297 <sup>a</sup>	0.147 <sup>a</sup>
Subcutaneous adipocyte	0.662 <sup>b</sup>	0.480 <sup>b</sup>	0.264 <sup>a</sup>	0.144 <sup>a</sup>
Heart	0.152 <sup>c</sup>	0.155 <sup>c</sup>	0.147 <sup>b</sup>	0.063 <sup>b</sup>
Kidney	0.185 <sup>c</sup>	0.147 <sup>c</sup>	0.101 <sup>bc</sup>	0.052 <sup>b</sup>
Liver	0.176 <sup>c</sup>	0.161 <sup>c</sup>	0.099 <sup>bc</sup>	0.034 <sup>bc</sup>
Lung	0.200 <sup>c</sup>	0.146 <sup>c</sup>	0.100 <sup>bc</sup>	0.029 <sup>bc</sup>
Muscle	0.206 <sup>c</sup>	0.120 <sup>c</sup>	0.096 <sup>c</sup>	0.030 <sup>bc</sup>
Spleen	0.182 <sup>c</sup>	0.117 <sup>c</sup>	0.057 <sup>c</sup>	0.005 <sup>c</sup>
S.E.M <sup>2)</sup>	0.030	0.026	0.020	0.015

<sup>1)</sup> Optical density was measured at 405 nm using a microplate reader.

<sup>2)</sup> Standard error of means.

<sup>a,b,c</sup> Means with different superscripts within the same row are significantly different ( $p < 0.05$ ).

**Table 2. Optical density of antiserum against Hanwoo subcutaneous adipocyte plasma membrane proteins (NIAS-H201) with abdominal and subcutaneous adipocytes, heart, kidney, liver, lung, muscle and spleen of Hanwoo**

Items	3 k	9 k	27 k	81 k
Abdominal adipocyte	1.157 <sup>1)b</sup>	0.764 <sup>b</sup>	0.476 <sup>a</sup>	0.221 <sup>a</sup>
Subcutaneous adipocyte	1.233 <sup>a</sup>	0.910 <sup>a</sup>	0.529 <sup>a</sup>	0.211 <sup>a</sup>
Heart	0.158 <sup>c</sup>	0.098 <sup>c</sup>	0.081 <sup>bc</sup>	0.015 <sup>c</sup>
Kidney	0.220 <sup>cd</sup>	0.070 <sup>c</sup>	0.032 <sup>c</sup>	0.021 <sup>c</sup>
Liver	0.185 <sup>de</sup>	0.115 <sup>de</sup>	0.080 <sup>bc</sup>	0.019 <sup>c</sup>
Lung	0.238 <sup>c</sup>	0.184 <sup>c</sup>	0.129 <sup>b</sup>	0.105 <sup>b</sup>
Muscle	0.154 <sup>c</sup>	0.095 <sup>c</sup>	0.070 <sup>bc</sup>	0.029 <sup>c</sup>
Spleen	0.244 <sup>c</sup>	0.164 <sup>cd</sup>	0.076 <sup>bc</sup>	0.022 <sup>c</sup>
S.E.M <sup>2)</sup>	0.016	0.025	0.031	0.006

<sup>1)</sup> Optical density was measured at 405 nm using a microplate reader.

<sup>2)</sup> Standard error of means

<sup>a,b,c,d,e</sup> Means with different superscripts within the same row are significantly different ( $p < 0.05$ )

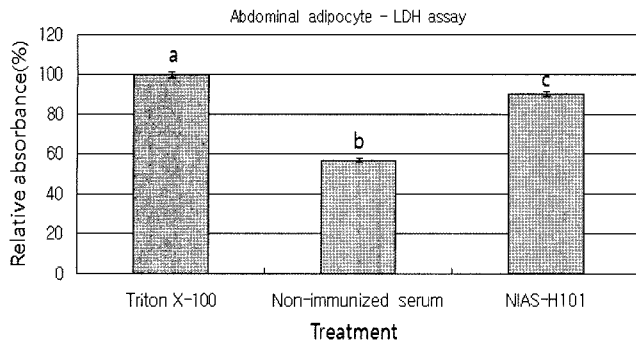
이 피하지방 특이항체는 주요장기세포 단백질들과는 달리 전 회석배율에서 지방세포 원형질막 단백질에 대해 유의적으로 강한 반응을 나타내고 있으며, 예상했던 바와 같이 피하지방 특이항체는 피하지방세포와 3 k 및 9 k 회석배율에서 복강지방세포와도 유의적인 차이를 나타내어 복강지방항체와 유사한 특성을 가지는 것으로 확인되었다.

부위별 지방세포간 교차반응의 차이는 SDS-PAGE 상에서 단백질의 종류가 복강지방보다 피하지방에서 다소 많았던 점에 기인한 결과로 사료되며(Fig. 1), 피하지방 특이 항체의 항원성 부위(epitope)가 복강지방 특이 항체보다 많기 때문에 보다 높은 수준의 교차반응을 나타낸 것

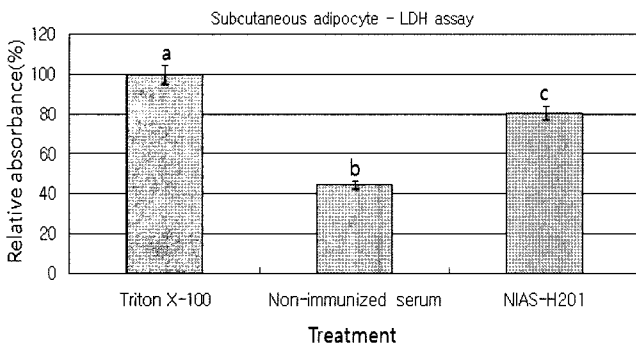
으로 추측된다. 1:3,000배의 회석배율에서 매우 미미하지만 복강지방 및 피하지방 특이 항체와 주요장기세포 원형질막 단백질들과의 교차반응성은 항혈청 내 함유된 혈청 단백질들이 ELISA 시 coating된 항원 단백질들과 결합해 발생하는 일종의 비특이적 반응으로 알려져 있어(Baek, 2003), 본 연구에서 개발된 항체와 주요장기세포 간의 교차반응 정도는 매우 미약하거나 없는 것으로 판단된다. Nassar와 Hu(1992)는 면양의 지방세포 원형질막에 대해 개발된 다클론 항체의 교차반응성을 간장, 신장, 심장 및 적혈구의 원형질막 단백질을 이용하여 측정해본 결과, 생산된 항체는 지방세포에 특이적으로 작용한다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 나타내었으며, 국내에서도 Choi 등(1997)이 한우 전체 지방세포 원형질막에 대한 항체가 지방세포에 특이적으로 강한 반응을 나타내는 반면, 간장, 비장, 심장, 신장 등의 조직과 매우 미약한 반응을 나타낸다고 보고하였다. 하지만, Pantou 등(1990)은 AS 164 및 AS 83항체를 흰쥐에 처리하였을 때, 백혈구, 신장, 뇌 및 근육세포와는 특별한 반응이 일어나지 않았으나, 간세포에 대해 비교적 높은 교차반응을 나타낸다고 보고하였다. 닭의 경우, Dong 등(1991)은 면양을 통해 생산한 닭 지방세포에 대한 항체가 심장, 신장, 간 및 근육세포 원형질막 단백질에 대해 전반적으로 높은 교차반응성을 가진다고 보고하였으며, 특히 심장에서 매우 강한 교차반응이 일어난다고 밝혔다. 이러한 결과들을 종합해볼 때, 본 연구에서 생산한 항체들은 한우 지방세포에 매우 특이적으로 작용을 하고 있으며, 궁극적으로 전체 지방조직을 대상으로 생산한 기존의 연구들에서 개발된 항체들과 비교해 본 연구에서 개발된 부위별 지방 특이 항체는 타장기와의 교차반응성을 크게 감소시킨 것으로 판단된다.

#### 한우 부위별 지방세포 특이 항체의 세포독성 효과

Fig. 6은 한우 복강지방 특이 항체가 실제 살아있는 복강지방세포에게 미치는 *in vitro* 지방세포 감소효과를 나타낸 것이다. Triton X-100의 지방세포 감소효과를 기준으로 측정된 한우 복강지방 특이 항체는 비면역혈청 대비 유의적으로 높은 LDH 수준을 나타내었다( $p < 0.05$ ). 비면역혈청 대비 항체처리구에서 나타난 유의적으로 높은 LDH 수준은 결국 복강지방 특이 항체가 살아있는 복강지방 세포에 직접적으로 작용을 하여 궁극적으로 지방세포를 용해시켜 배지 내 LDH 수준을 증가시킨 것으로 보이며, 이는 지방세포에 대한 항체의 세포독성효과를 간접적으로 보여주고 있는 것이다. 피하지방 특이 항체의 경우 또한 항혈청 처리구의 LDH 수준이 비면역혈청 처리구와 비교해 유의적으로 증가해( $p < 0.05$ ), 피하지방 세포에 강한 세포독성 효과를 나타내고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 7). Flint 등(1986)은 흰쥐 지방세포에 대한 항체를 혈청에 1.25%, 2.5%, 5%, 10% 및 20% 첨가한 뒤 배양중인 지방



**Fig. 6.** Relative lactate dehydrogenase (LDH) activity released from confluent Hanwoo abdominal adipocyte culture by antiserum against Hanwoo abdominal adipocyte plasma membrane proteins (NIAS-H101) treatment. Means±S.E. (n=4). Values with different superscripts are different ( $p<0.05$ ).



**Fig. 7.** Relative lactate dehydrogenase (LDH) activity released from confluent Hanwoo subcutaneous adipocyte culture by antiserum against Hanwoo subcutaneous adipocyte plasma membrane proteins (NIAS-H201) treatment. Means±S.E. (n=4). Values with different superscripts are different ( $p<0.05$ ).

세포에 주입한 결과, 처리 농도가 증가함에 따라 배양액 내 LDH 방출 수준 또한 증가되어 본 연구의 결과와 일치하였다. Pantou 등(1990)도 흰쥐 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항혈청이 지방세포에 강한 세포독성 효과를 나타낸다는 것을 확인하였다. 또한, Butterwith 등(1989)은 닭 지방세포에 대한 항체가 가지는 *in vitro* 지방세포 감소효과는 성숙한 지방세포뿐만 아니라 지방 전구세포에게도 나타난다고 보고하였다. 국내에서도 Baek 등(2000)이 흰쥐 지방세포 원형질막 단백질에 대한 항체를 생산한 뒤 흰쥐 지방세포에 1:10의 희석배율로 처리한 결과, 항체는 비면역혈청과 비교하여 유의적인( $p<0.01$ ) 지방세포 감소효과를 나타낸다고 하였으며, 돼지의 경우 또한 비면역혈청 대비 항체의 유의적인( $p<0.01$ ) 지방세포 감소효과가 LDH assay를 통해 보고된 바 있다(Baek *et al.*, 2005).

한우 불가식 체지방 감소육 생산을 위한 연구의 첫 단계로 실시된 본 연구에서 한우 부위별 지방 특이 항체의 개발에 성공하였으며, 생산된 항체가 가지는 타장기와의

교차반응성 또한 기존의 연구들에서 보고되었던 항체들보다 훨씬 낮아진 것으로 나타났다. 또한 LDH assay를 통해 실제 항체가 지방세포에 대해 가지는 강한 지방세포 감소효과를 검정할 수 있었다. 현재 생산된 항체 간의 cross-cytotoxicity 연구를 진행 중에 있으며, 향후 본 항체를 한우에 직접 적용하는 항체의 영양생리 및 대사 안전성에 관한 연구와 항체의 부위별 *in vivo* 세포독성 연구가 계속될 것이다. 앞으로 본 면역학적 기술을 통한 한우 저지방 고급육의 생산의 산업화를 위해 적정 주사시기, 적정 항체량, 주사 부위, 개체 간 면역학적 변이(variation)에 대한 보정, 항체 운반체(carrier) 및 항체의 저장기법 등과 관련된 지속적인 연구들이 수행되어야 할 것이다.

## 요 약

본 연구는 국내 고유종인 한우의 부위별 불가식 체지방 감소를 위한 특이 다클론 항체의 개발 및 타장기 안전성을 확인하고자 실시되었다. Collagenase digestion 방법으로 한우의 복강 및 피하지방세포 원형질막 단백질을 분리하여 면양에 3회에 걸쳐 수동면역 주사하고, 면역 주사 전 및 후에 비면역혈청과 항혈청(항체)을 생산하였다. 생산된 한우 부위별 지방 항체의 역가와 한우의 주요 장기 조직인 심장, 신장, 간장, 폐, 근육 및 비장세포의 원형질막 단백질에 대한 타장기 교차반응성과 한우의 부위별 지방 조직에서 지방세포를 분리하고 각각 배양시킨 후 개발된 한우 지방 항체를 직접 주입한 뒤 LDH 수준을 조사하였다. 복강 및 피하지방세포 원형질막 단백질들은 서로 유사하면서도 특이적인 단백질을 가지고 있는 것으로 SDS-PAGE 분석을 통해 확인할 수 있었다. 희석배율 1:1,000배를 기준으로 비면역혈청은 항원-항체 결합 반응이 거의 측정되지 않았으나, 복강 및 피하지방 항체는 희석배율 1:128,000배 및 1:64,000배까지 각각 항원-항체 반응이 감지되었으며, 이는 본 연구에서 생산한 부위별 지방 특이 다클론 항체가 지방세포 원형질막 단백질에 대해 매우 강한 역가를 가진 항체임을 시사한다. 또한 복강 및 피하지방 항체는 타 장기들과는 특이한 반응을 나타내지 않았다. 본 연구에서 개발한 두 항체들은 모두 항원으로 이용된 부위의 지방세포 원형질막 단백질과 가장 높은 반응을 나타내었으며, 복강 및 피하지방 특이항체는 비면역혈청에 비해 유의적으로 높은 세포독성 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 종합할 때 본 연구에서 개발된 복강 및 피하 지방 감소 다클론 항체는 높은 역가, 타 장기 안전성 및 세포 파괴 효과가 있었으며 생체 타장기 안전성 등 향후 기존의 전체 지방에서 생산한 항체의 단점을 보완할 수 있는 연구가 지속될 경우 불가식 체지방이 감소된 저지방 한우 고급육 생산이 가능하리라고 사료된다.



## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 축산과학원 기관프로젝트 수행결과로 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Baek, K. H. (2003) Studies on the production of lean meats and the identification of Hanwoo (Korean Cattle) brand beef using immunological techniques. Ph.D. thesis. Yeungnam Univ., Gyeongsan, Korea.
2. Baek, K. H., Kwak, T. H., Oh, Y. S., Choi, C. W., Jung, K. K., and Choi, C. B. (2005) Studies on the development and utilization of polyclonal antibodies against swine adipocyte plasma membrane proteins. *J. Anim. Sci. Technol. (in Korean)* **47**, 19-28.
3. Baek, K. H., Kwon, E. J., Kwak, T. H., Jung, K. K., and Choi, C. B. (2000) In vitro cytotoxicity of polyclonal antibodies against proteins isolated from adipocyte plasma membrane of rats. *J. Anim. Sci. Technol. (in Korean)* **42**, 261-268.
4. Butterwith, S. C., Kestin, S., Griffin, H. D., and Flint, D. J. (1989) Cytotoxic antibodies to chicken adipocytes and their precursors: Lack of tissue specificity. *Br. Poult. Sci.* **30**, 371-378.
5. Butterwith, S. C., Kestin, S., Griffin, H. D., Beattie, J., and Flint, D. J. (1992) Identification of chicken (*Gallus Domesticus*) adipocyte plasma membrane and differentiation specific proteins using SDS-PAGE and western blotting. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **101**, 147-151.
6. Chikhou, F. H., Moloney, A. P., Allen, P., Quirke, J. F., Austin, F. H., and Roche, J. F. (1993) Long-term effects of cimaterol in friesian steers: Growth, feed efficiency, and selected carcass traits. *J. Anim. Sci.* **71**, 906-913.
7. Choi, C. B., Lee, M. J., and Kwon, E. J. (1997) Development of polyclonal antibody to adipocyte plasma membrane proteins isolated from Korean native cattle. *Korean J. Anim. Sci.* **39**, 669-674.
8. Choi, C. B., Lee, M. J., and Kwon, E. J. (1998) Production of polyclonal antibodies specific to porcine adipocyte plasma membrane proteins in sheep. *Korean J. Biomed. Lab. Sci.* **4**, 57-63.
9. Choi, C. B. and Lee, S. R. (1996) Studies on the production of lean pork by immunological approach - Development of antibodies to porcine adipocyte plasma membrane. *Korean J. Anim. Sci.* **38**, 369-374.
10. Dickerson, G. E. (1985) Potential use of genetic variation in components of animal growth. *J. Anim. Sci.* **61**, 104-117.
11. Dong, J., Froman, D. P., and Hu, C. Y. (1991) Development and characterization of polyclonal antibodies against chicken adipocytes. *Comp. Biochem. Physiol. A* **99**, 195-198.
12. Duncan, D. B. (1955) Multiple range and multiple F test. *Biometrics* **11**, 1-42.
13. Flint, D. J., Coggrave H., C. E. Futter., Gardner, M. J., and Clarke, D. J. (1986) Stimulatory and cytotoxic effects of an antiserum to adipocyte plasma membranes on adipose tissue metabolism in vitro and in vivo. *Int. J. Obes.* **10**, 69-77.
14. Flint, D. J. (1992) Immunological manipulation of adiposity. *Proc. Nutr. Soc.* **51**, 433-439.
15. Flint, D. J. (1994) Immunomodulatory approaches for regulation of growth and body composition. *Anim. Proc.* **58**, 301-312.
16. Kawai, Y. and Spiro, R. G. (1977a) Fat cell plasma membranes. I. Preparation, characterization, and chemical composition. *Biol. Chem.* **252**, 6229-6235.
17. Kawai, Y. and Spiro, R. G. (1977b) Fat cell plasma membranes. II. Studies on the glycoprotein components. *Biol. Chem.* **252**, 6236-6244.
18. Kestin, S., Kennedy, R., Tonner, E., Kiernan, M., Cryer, A., Griffin, H., Butterwith, S., Rhind, S., and Flint, D. J. (1993) Decreased fat content and increased lean in pigs treated with antibodies to adipocyte plasma membranes. *J. Anim. Sci.* **71**, 1486-1494.
19. Kim, S. H., Byun, S. H., Lee, S. M., Hwang, J. H., Jeon, B. T., Moon, S. H., and Sung, S. H. (2007) Effects of supplementation period and levels of fermented mineral feed (Power-Mix®) on the growth and carcass characteristics of Hanwoo steer. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **27**, 450-456.
20. Lo, H. F., August, T. R., Libeman, U. A., and Edelman, I. S. (1976) Dependence of renal (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)-adenosine triphosphatase activity on thyroid status. *J. Biol. Chem.* **251**, 7826-7833.
21. Moloney, A. P. (1995) Immunomodulation of fat deposition. *Livest. Prod. Sci.* **42**, 239-245.
22. Moloney, A. P., Allen, P., Ross, D. B., Olson, G., and Convey, E. M. (1990) Growth, feed efficiency and carcass composition of finishing friesian steers fed the  $\beta$ -adrenergic agonist L-644,969. *J. Anim. Sci.* **68**, 1269-1277.
23. Nassar, A. H. and Hu, C. Y. (1991a) Growth and carcass characteristics of lambs passively immunized with antibodies developed against ovine adipocyte plasma membranes. *J. Anim. Sci.* **69**, 578-586.
24. Nassar, A. H. and Hu, C. Y. (1991b) Antibodies to ovine adipocyte plasma membranes recognize tissue and species specific plasma membrane components. *Comp. Biochem. Physiol.* **98B**, 361-367.
25. Nassar, A. H. and Hu, C. Y. (1992) Characterization of polyclonal antibodies against ovine adipocyte plasma membranes. *Int. J. Biochem.* **24**, 599-604.
26. Pantou, D., Futter, C. E., and Kestin., S. (1990) Increased growth and protein deposition in rats treated with antibodies to adipocytes. *Am. J. Physiol.* **258**, E985-E989.

(2008.08.29 접수/2008.10.31 수정1/2008.12.01 수정2/  
2008.12.04 채택)